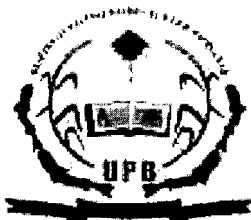


MINISTÈRE DES ENSEIGNEMENTS
SECONDAIRE, SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ POLYTECHNIQUE DE
BOBO-DIOULASSO (UPB)

INSTITUT DU DÉVELOPPEMENT
RURAL
(IDR)



N° d'ordre :

CENTRE D'INFORMATIONS, DE
CONSEILS ET DE DOCUMENTATION
SUR LE SIDA ET LA TUBERCULOSE
(CICDOC)

LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE



MEMOIRE DE DEA

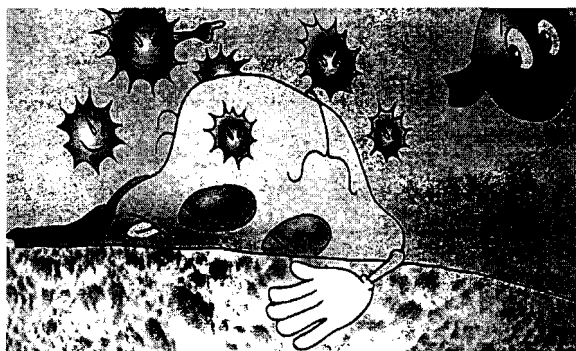
Présenté par : **Esther Yéri HIEN** (*Maître ès sciences*)

Option : Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)

Thème

Suivi Biologique des Personnes Vivants avec le VIH sous ARV : Interférence des monocytes dans la numération des CD4

Les lymphocytes T CD4 cibles du VIH : le
grand dérapage



Soutenu le 25 mai 2010, devant le Jury

Président : -Pr Georges A. OUEDRAOGO, UPB/IDR

Membres : - Pr Yves TRAORE, UFR/SVT, UO

- Dr Juliette DIALLO, UPB/INSSA

DEDICACES

DEDICACES

Ce mémoire est dédié

A mon très cher regretté Père,

A ma Mère qui a consenti d'énormes sacrifices pour que
je réussisse dans mes études,

A mes Frères et Sœurs pour leurs soutiens et conseils,

A tous ceux qui m'ont soutenu et qui continuent de le
faire.

REMERCIEMENTS

Que toutes les personnes qui ont contribuées d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail reçoivent ici nos profondes gratitudee.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements :

✚ Au Pr Yves TRAORE Immunologiste à l'UFR/SVT de l'Université de Ouagadougou, notre directeur de mémoire pour avoir accepté de nous encadrer. Nous tenons à vous remercier pour la confiance placée en nous. Merci très sincèrement Pr TRAORE pour tout l'encadrement, le soutien et les connaissances que vous nous avez transmises.

✚ Au Pr Pascal NIAMBA Directeur Général du CICDOC pour avoir accepté que l'étude se passe dans son centre. Merci pour vos conseils et suggestions qui ont contribués à la bonne marche du travail.

✚ Au Dr Serge SAWADOGO Immunologiste à l'UFR/SDS de l'université de Ouagadougou pour ses conseils et encouragements.

✚ Aux Médecins des associations membres du CICDoc Dr KONSEIMBO, Dr BADOUM et Dr YAMEOGO, pour nous avoir fourni les informations nécessaires à la bonne marche de ce travail.

✚ A l'ensemble du personnel du CICDOC pour leur disponibilité constante envers nous.

✚ Aux infirmières qui nous ont aidées à remplir nos fiches de collecte des données.

✚ A Mr Simon TIENDREBEOGO Biostatisticien à l'Institut de Recherche en Science de la Santé (IRSS) Ouaga pour nous avoir aidé à l'analyse des données.

✚ A l'ensemble du personnel du laboratoire d'Immunologie du Pr Yves TRAORE pour ces bons moments passés ensemble.

✚ A Mr Samuel N. SAWADOGO, mon logeur à bobo pour son hospitalité et ses conseils.

✚ A tous les camarades de promotion ; particulièrement à Mr DIKOUMBA Anicet Clotaire, et Mlle Oumou CAMARA.

✚ Aux amis : Emilie DAMA, Monique SORO, Denise KABORE, merci pour votre soutien et vos encouragements.

✚ A tous ceux qui ont apporté des corrections à ce document ; Célestine KAMBOU, Osée KAMBOU, Robert Ata DAH, Pômileyi DAH. Merci pour votre disponibilité.

✚ A tous les parents et amis pour leurs soutiens et leur prières

SOMMAIRE

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS.....	II
SOMMAIRE.....	III
RESUME.....	V
SIGLES ET ABREVIATIONS	VII
LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES.....	IX
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE VIH /SIDA.....	4
I.1. VIH.....	4
I.1.1. Généralités.....	4
I.1.2. Transmission et épidémiologie.....	6
I.1.3. Les récepteurs membranaires du virus.....	7
I.1.4. La réplication virale.....	8
I.1.5. La physiopathologie de l'infection au VIH.....	10
I.1.6. VIH et cellules de la lignée monocyttaire.....	12
I.2. SIDA.....	13
I.2.1. Définition des stades cliniques.....	13
I.2.2. Les ARV.....	15
I.2.2.1. Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI).....	16
I.2.2.2. Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase.....	17
I.2.2.3. Les inhibiteurs de protéases.....	17
I.2.2.4. L'observance des traitements ARV.....	18
CHAPITRE II : GENERALITES SUR LA CYTOMETRIE EN FLUX.....	19
II.1. Historique.....	19
II.2. Définition.....	19
II.3. Principe.....	20
II.3.1. Le système fluïdique.....	23
II.3.2. Le système optique.....	23
II.3.3. Le système électronique.....	24
II.4. Les applications de la cytométrie en flux.....	25
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	26
CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES.....	27
I.1. Conception de l'étude.....	27
I.2. Collecte des données.....	27
I.3. Equipements et réactifs.....	27
I.4. Matériel biologique et traitement de l'échantillon.....	31
I.4.1. Matériel biologique.....	31
I.4.2. Traitement de l'échantillon.....	32
I.5. Contrôle de qualité.....	33
I.6. Analyse des données.....	34

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSION.....	35
II.1. Caractéristiques sociodémographiques des patients.....	35
II.2. Caractéristiques biologique des patients.....	36
II.2.1. Répartition des patients en fonction du type de VIH.....	36
II.2.2. Niveau d'immunodépression des patients.....	37
II.3. Profile des leucocytes des patients.....	39
II.4. Traitement suivi.....	40
II.4.1. Temps d'attente avant la mise sous traitement.....	40
II.4.2. Traitements ARV.....	41
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	45

RESUME

Le syndrome de l'Immuno-Déficience Acquise (SIDA) est une maladie décrite pour la première fois en 1981 ; elle est due à la chute du nombre de lymphocytes T CD4. Deux virus sont responsables du SIDA chez l'homme, le VIH-1 et le VIH-2. Ces deux virus ont une structure très voisine et font partie de la famille des rétrovirus[1].

Selon l'OMS et l'ONUSIDA en 2008, il y avait plus de 33,4 millions [31,1 millions–35,8 millions] de personnes dans le monde vivant avec le VIH, dont plus de 67% en Afrique sub-saharienne. Chaque jour il y a environ 6800 nouvelles infections et 5700 décès dus au VIH. Au Burkina Faso, la séroprévalence moyenne nationale semble se stabiliser depuis 2006 autour de 1,6%. Malgré cette prévalence relativement faible, le nombre de personnes infectées est considérable. Pour 2008, on estime à 130.000, le nombre de personnes infectées par le VIH, dont 66.044 sont des femmes et 5.058 des enfants de 0-14 ans. Le nombre d'orphelins dus au sida est estimé à 124.354 et le nombre de décès annuels à 8.795 décès[2].

Le suivi biologique des personnes infectées nécessite l'exploration d'un certains nombres de marqueurs. L'un d'eux est le nombre de lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique. La connaissance du nombre de lymphocytes T CD4 permet de déterminer le moment opportun pour débiter un traitement aux ARV et/ou aux antibiotiques pour la prophylaxie mais aussi de mesurer l'efficacité thérapeutique chez les patients sous un traitement aux ARV.

L'une des méthodes les plus utilisées pour la numération des lymphocytes T CD4 est la cytométrie en flux. C'est une méthode qui utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs membranaires des cellules ce qui permet d'identifier des sous populations cellulaires spécifiques. Chez certaines PVVIH, des perturbations hématologiques entraînent une interférence des monocytes avec les lymphocytes T CD4 pouvant donner des résultats imprécis ou empêcher d'avoir une numération. Pourtant le suivi biologique étant un impératif pour une prise en charge efficace des patients, la numération des lymphocytes T CD4 doit être précise et toujours disponible.

C'est dans ce sens que cette étude s'est fixée comme objectifs, de déterminer les facteurs qui sont à l'origine de l'interférence des monocytes sur les lymphocytes T CD4 ainsi que les mesures à prendre en vue d'améliorer le suivi biologique chez ces patients.

Pour cette étude, l'échantillonnage a porté sur 635 PVVIH provenant des associations membres du CICDOC. Parmi ces patients, 76 ont été retenus sur la base de leur profil en cytométrie. Ils étaient composés d'individus âgés de 18 à 60ans avec 73,7% de femmes. Par

ailleurs, 76% des patients étaient infectés par le VIH-1, 22,7% par le VIH-2 et 1,3% par les deux types de VIH.

Pour le traitement aux ARV, nous avons noté que la plupart des patients arrivaient dans les centres de prise en charge à un stade tardif de la maladie et étaient immédiatement mis sous un traitement aux ARV. D'autre part, les hommes sous un traitement aux ARV étaient trois fois plus nombreux que les femmes qui sont pourtant quatre fois plus nombreuses dans l'effectif général.

L'exploration des divers paramètres tels que l'âge, le sexe, le type de VIH, le stade de la maladie, le temps d'attente avant la mise sous traitement aux ARV, l'observance du traitement, la durée du traitement ainsi que les différents protocoles thérapeutiques utilisés par les patients, n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation significative qui pourrait expliquer le profil cytométrique des patients inclus.

Cependant nous avons observé que la mise sous traitement se fait sans règle précise ni par rapport au CD4 ni par rapport aux signes cliniques. Ce travail mérite d'être poursuivi et plus particulièrement l'exploration de la modulation de l'expression des récepteurs CD4 des lymphocytes T CD4 et des monocytes infectés.

SIGLE ET ABREVIATION

Ac : anticorps

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique, molécule support de l'information génétique.

ADNc : ou ADN complémentaire ; c'est un ADN obtenu après une réaction de transcription inverse d'un ARNm à maturité.

Anticorps monoclonaux : ce sont des anticorps qui ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont par définition tous identiques et produits par un seul clone de plasmocyte.

ARN : L'acide ribonucléique, c'est une molécule biologique produit par transcription à partir de l'ADN.

ARV : Anti Retro Viraux

BCR : B Cells Receptors

CD : Cluster of Différenciation ou Classe de Différenciation

Cel/ μ l : nombre de cellules par microlitre de sang.

CICDOC : Centre d'Information, de Conseils et de DOCumentation sur le sida et la tuberculose

CMF : CytoMétrie en Flux

Da : Dalton ; c'est une unité de mesure de l'ADN une paire de base de l'ADN vaut en moyenne 660 Da.

DY647 : DYomics 647, c'est une molécule fluorescente. Excitation : 488 nm
Emission : 672 nm

Env : Enveloppe

FL : ce sont des paramètres optiques qui permettent de collecter les signaux

FSC : Forward SCatter ou signaux diffusés vers l'avant

Gag: Group antigen

gp : glycoprotéine

IFN : interféron ; c'est une cytokine qui combat les virus en inhibant la multiplication de ceux-ci.

Ig : immunoglobuline

LASER : ce terme provient de l'acronyme anglo-américain « light amplification by stimulated emission of radiation » en français : « amplification de la lumière par émission stimulée de radiation ». C'est un appareil pouvant engendrer un faisceau de rayonnement cohérent dans l'espace et dans le temps, et susceptible de multiples applications.

Light scatter : lumière dispersée

LL : Low Level ou seuil de détection

NFS : Numération Formule sanguine, c'est une l'analyse quantitative (numération) et qualitative (formule) des éléments figurés du sang.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

Pol : Polymerase

PVVIH : Personnes Vivant avec le Virus de l'Immunodéficience Humaine.

RT : Reverse Transcriptase.

SI : Système Immunitaire.

SIDA : Syndrome de l'Immuno Déficience Humaine.

SSC : Side SCatter ou signaux diffusés à 90°

TCR : T Cells Receptors.

TNF : pour Tumor Necrosis Factor ou facteur de nécrose tumorale. C'est une cytokine élaborée par les macrophages et certains lymphocytes T. Toxique pour les cellules, elle joue un rôle dans les réponses inflammatoires.

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

<u>Fig.1</u> : Coupe schématique du VIH.....	4
<u>Fig.2</u> : The different levels of HIV classification.....	5
<u>Fig.3</u> : Schéma de la réplication du VIH.....	10
<u>Fig.4</u> : Schéma de fonctionnement d'un trieur de cellule.....	22
<u>Fig.5</u> : CyFlow® Counter.....	28
<u>Fig.6</u> : Analyse de cytométrie par le protocole CD4 simple.....	29
<u>Fig.7</u> : Count Check Beads.....	30
<u>Fig.8</u> : Kit CD4%.....	30
<u>Fig.9</u> : Decontamination solution and Cleaning solution.....	30
<u>Fig.10</u> : Analyse de cytométrie par le protocole CD4%.....	33
<u>Fig.11</u> : Préparation des échantillons.....	34
<u>Tableau 1</u> : Catégories d'âge des patients.....	35
<u>Tableau 2</u> : Répartition des patients en fonction du type de VIH.....	36
<u>Tableau 3</u> : Tableau croisé sexe du patient/type de VIH.....	37
<u>Tableau 4</u> : Répartition des patients en fonction des niveaux de CD4.....	37
<u>Tableau 5</u> : Tableau croisé niveau de CD4/traitement ARV.....	39
<u>Tableau 6</u> : Temps d'attente avant la mise sous ARV.....	41
<u>Tableau 7</u> : Tableau croisé Sexe du patient/Traitement ARV.....	42
<u>Tableau 8</u> : Observance du traitement D4T+3TC+NEV/EFV	42
<u>Tableau 9</u> : Observance du traitement D4T+3TC+NEV ou EFV.....	43

INTRODUCTION

Selon les données de l'OMS et de l'ONUSIDA en 2008, il y avait plus de 33,4 millions [31,1 millions–35,8 millions] de personnes dans le monde vivant avec le VIH, dont plus de 67% en Afrique sub-saharienne. 2,1 millions [1,2 million–2,9 millions] d'enfants dans le monde sont infectés par le VIH dont environ 91% en Afrique sub-saharienne. L'Afrique est le foyer de 95% des transmissions du VIH de la mère à l'enfant. Cette propagation du VIH a inversé tous les progrès réalisés en Afrique durant de nombreuses années dans le domaine de la santé, de l'éducation, de l'espérance de vie et du niveau de vie des populations[3].

Depuis la notification des premiers cas de l'infection à VIH au Burkina Faso en 1986, de nombreuses actions ont été développées en vue de réduire sa transmission et d'assurer une prise en charge des personnes infectées. Selon les estimations, le taux de séroprévalence moyenne semble se stabiliser depuis 2006 au taux moyen de 1,6%. Malgré cette prévalence relativement faible, le nombre de personnes infectées est considérable au Burkina Faso. Pour 2008, on a estimé le nombre de personnes infectées par le VIH à 130 000, dont 66 044 sont des femmes et 5 058 des enfants de 0-14 ans et les décès annuels à 8 795. Cette situation a des répercussions socio-économiques multiples aussi bien sur les ménages que sur le système de santé[2]. La situation de cette pandémie nécessite un bon suivi biologique des patients ; qui permettra en plus d'améliorer leur état de santé, de diminuer leur niveau d'infection ainsi que la propagation de la maladie.

A l'heure actuelle, l'accessibilité accrue des traitements aux ARV a considérablement augmenté la survie et le confort des patients. Néanmoins, pour rendre le traitement plus efficace, il est impératif de disposer d'un bon suivi immunologique et virologique des patients. Le suivi biologique est donc essentiel pour une prise en charge efficace des PVVIH. Le bilan initial de suivi des patients ainsi que le suivi des patients traités ou non est fondé sur le dosage de certains paramètres biochimiques (transaminases, amylases), hématologiques (NFS), la mesure du taux de lymphocytes T CD4 circulant et de la charge virale par la mesure du nombre de copies de l'ARN dans le sang ou le lait maternel[2, 4].

La numération des lymphocytes CD4 détermine le nombre de ces cellules dans le sang périphérique. Le nombre de ces cellules est une bonne indication du niveau d'immunodépression du patient et constitue le marqueur essentiel d'indication de la mise sous un traitement antirétroviral (en dehors du stade IV de l'OMS). Il est classiquement recommandé de faire ce test à l'inclusion et tous trois à six mois (que les patients soient sous un traitement ARV ou non), sauf chez les malades asymptomatiques non traités ayant plus de 500 lymphocytes T CD4/ μ l de sang. Cette numération permet non seulement de déterminer le

moment opportun pour débiter un traitement aux ARV et/ou aux antibiotiques pour la prophylaxie mais aussi de mesurer l'efficacité thérapeutique chez les patients sous traitement ARV[4].

La numération de ces cellules nécessite l'utilisation de techniques appropriées. L'une des techniques utilisées est la CMF, qui est un outil de diagnostic très important au sein des laboratoires modernes. Les cytomètres en flux permettent l'analyse des milliers de cellules en quelques secondes en tenant compte de leur phénotype c'est-à-dire des récepteurs exprimés sur leur membranes et classent précisément les différentes populations cellulaires[5]. En effet les leucocytes se différencient par leur rôle dans la défense de l'organisme, leur morphologie, la complexité de leur cytoplasme mais également par la présence de récepteurs spécifiques présents à leur surface membranaire[6]. Ainsi ces récepteurs sont exploités pour la numération des sous types leucocytaires notamment les lymphocytes T CD4 dans le suivi biologique des PVVIH.

Des perturbations hématologiques d'origine inconnue sont généralement rencontrées chez de nombreux PVVIH. Ces perturbations peuvent affecter certaines sous populations leucocytaires aussi bien qualitativement que quantitativement[7]. Ce qui pourrait influencer la numération de ces cellules par la méthode de la CMF. En effet, chez certains PVVIH, le cytogramme montre une très large gamme de fluorescence de la population des lymphocytes T CD4, synonyme d'une hétérogénéité au niveau de l'expression des récepteurs CD4 dans cette sous population leucocytaire. Aussi certaines de ces cellules ont le même niveau de fluorescence que les monocytes et tendent à se confondre à ces derniers.

En nous basant sur ces observations, nous avons émis l'hypothèse que des variations qualitatives et quantitatives des récepteurs CD4 des lymphocytes chez certains patients entraîneraient une interférence des monocytes avec les lymphocytes T CD4 lors de leur numération et pourraient donner des résultats imprécis. Nous nous sommes proposé alors de déterminer les facteurs à l'origine de ce phénomène chez les PVVIH-1 et/ou 2. Plus spécifiquement de déterminer si les traitements suivis ainsi que l'état clinique des patients seraient à l'origine du profil cytométrique observé ; et de proposer des solutions pour une meilleure prise en charge de ces patients.

C'est dans ce cadre que nous avons choisi de conduire cette étude qui a consisté, dans un premier temps à identifier les patients qui présentaient ces profils particuliers du cytogramme et dans un second temps nous avons documenté sur l'état clinique des patients ainsi que les traitements suivis ; pour identifier les facteurs qui peuvent être à l'origine de ce phénomène.

Première Partie :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE VIH/SIDA

I.1 VIH

I.1.1 Généralités

Deux types du VIH sont responsables de l'infection et/ou du SIDA chez les humains[8] : le VIH-1 isolé en 1983 ; qui a une répartition cosmopolite et le VIH-2 isolé en 1986 dans certaines régions de l'Afrique de l'Ouest[9]. Le VIH-2 reste encore très localisé en Afrique de l'Ouest avec des cas sporadiques en Europe.

Le VIH est un virus enveloppé qui appartient à la famille des *Retroviridae*, genre *Lentivirus*. Les rétrovirus se présentent sous la forme d'une particule sphérique d'un diamètre de 80 à 100 nm. Ces virus sont responsables de cancers et de maladies d'évolution lente comme le SIDA[10]. Le génome viral est constitué de deux molécules identiques d'ARN associées à des protéines telles que la reverse transcriptase, l'intégrase, une protéase, ainsi que des protéines de protection. L'ensemble est entouré d'un corps cylindrique composé d'une protéine de 24 KDa appelé p24 qui constitue la capsid et d'une enveloppe virale qui ressemble à une membrane cellulaire lipidique où seraient enfoncés de multiples clous. Chaque clou est constitué d'une glycoprotéine gp120 et d'une autre gp41. Ces protéines de surface jouent un rôle important dans la fixation et la pénétration du VIH dans la cellule cible. L'intérieur de cette enveloppe est tapissé par des molécules de la protéine p17[1].

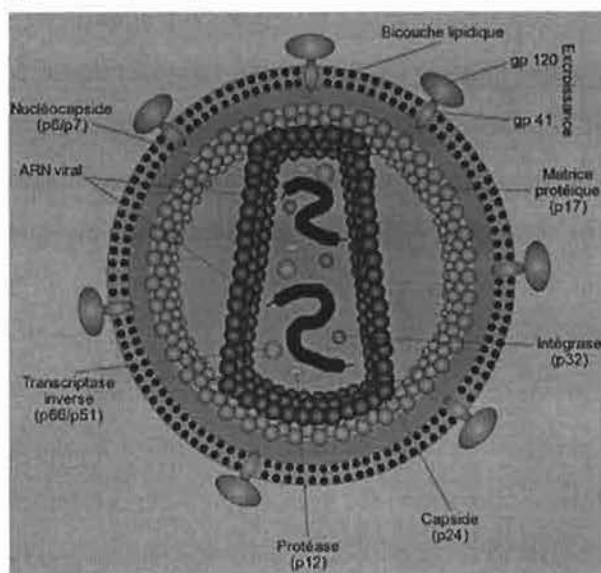


Fig.1 : Coupe schématique du VIH [11]

Bien qu'ils soient tous des rétrovirus, les deux sérotypes du VIH ont des pouvoirs pathogènes différents, le VIH-1 étant plus virulent que le VIH-2 [8]. Le VIH-1 et le VIH-2 comportent 60% d'homologie génomique au niveau des gènes gag et Pol et 40% au niveau des gènes env ; ce qui explique la possibilité d'avoir des réactions croisées entre les anticorps anti

VIH-1 et anti VIH-2. La variabilité génétique observée s'explique par les erreurs de transcription de la reverse transcriptase et la pression du système immunitaire qui sélectionne les variants capables d'échapper aux anticorps neutralisants de l'hôte. Cette variabilité génétique se situe généralement au niveau du gène codant pour le gp120[1, 10].

Il existe une très grande variation antigénique entre les différents isolements du VIH-1, notamment au niveau de la protéine de l'enveloppe, toutefois la plupart des protéines centrales sont remarquablement conservées[12]. Ainsi quatre groupes différents de VIH-1 ont été décrits : le M (majoritaire) avec 9 sous-types dénommés A, B, C, D, F, G, H, J, et K (En France 85 % des souches sont de sous type B), le O (out lier), le N et le P qui a été découvert en 2009. Ces groupes sont définis à partir des différences observées dans leurs séquences génomiques et leur pathogénicité. La différence de séquences génomiques entre ces sous types varie entre 15% - 20%[8].

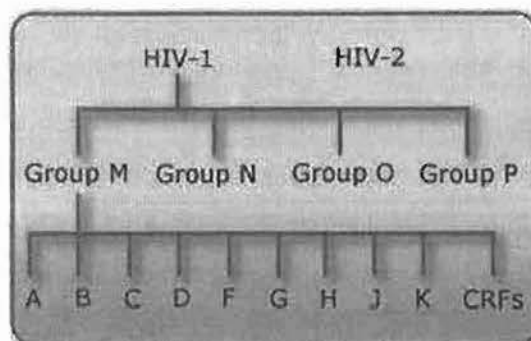


Fig.2: The different levels of HIV classification [13]

Les CRFs pour « formes circulantes recombinant » apparaissent lorsque deux sous-types différents du VIH-1 se rencontrent dans la cellule d'une personne infectée et mélangent leur matériel génétique pour créer un nouveau virus hybride. Beaucoup de ces nouvelles souches ne survivent pas longtemps, mais celles qui infectent plus d'une personne sont connues comme des CRF[14].

Contrairement au HIV-1, nous avons une faible prévalence du VIH-2 et les premières infections au HIV-2 ont été pour la première fois découvertes en Afrique de l'Ouest, en Inde, dans une moindre mesure au Portugal et dans certaines colonies portugaises. Aussi, le VIH-2 donne une progression lente vers le stade Sida et semble moins efficace dans la transmission aussi bien par la voie sexuelle que de la mère à l'enfant. Bien que le VIH-2 n'ait pas beaucoup de sous types comme le VIH-1, on distingue cinq sous-types dénommés A, B, C, D et E; parmi ces sous-types, le A et le B sont les plus impliqués dans les cas d'infections [8]. En outre, le VIH-2 montre par rapport au VIH-1 des diversités encore plus grandes au niveau de l'enveloppe, mais les protéines centrales semblent être conservées dans les deux virus[12]. Les

vaccins en cours devront donc être capables de protéger contre tous les sérotypes, et de préférence contre tous les sous types viraux. Toutefois, il convient de remarquer que la diversité génétique qui caractérise ces virus peut être retrouvée chez un même individu ; ce qui représente un obstacle à l'élaboration d'un vaccin[1].

I.1.2 Transmission et Epidémiologie

Quoiqu'aucune société n'ait été épargnée, la pandémie du SIDA se caractérise par une inégale répartition ; certaines régions étant plus affectées que d'autres. Cette inégale répartition de la pandémie révèle l'influence de certains facteurs biologiques et socio-économiques. En effet, parmi les régions affectées par cette pandémie, l'infection est plus concentrée dans les groupes marginalisés. La pauvreté, la maladie, la famine, l'instabilité politique et économique contribuent à la propagation de cette pandémie dans le monde.

Le VIH se transmet selon trois modes bien établis : par contact sexuel, qu'il soit hétérosexuel ou homosexuel ; par voie sanguine qui concerne particulièrement les utilisateurs de drogues injectables, les hémophiles, les transfusés, les professionnels de la santé ; et de la mère à l'enfant qui peut survenir in utero dans les dernières semaines de la grossesse, au moment de l'accouchement ou lors de l'allaitement[15].

Le contact avec le virus peut se traduire ou non par une infection ; et parmi les personnes infectées, c'est-à-dire celles qui présentent une séroconversion, nombreuses sont celles qui restent asymptomatiques pendant plusieurs années[12]. Quelque soit la voie d'entrée du VIH dans l'organisme, l'infection dépend de la charge virale du liquide biologique, c'est-à-dire la concentration du virus et des cellules infectées par le virus dans le liquide biologique ainsi que de la susceptibilité du sujet. La concentration du VIH dans le liquide biologique varie en fonction du stade de la maladie. Le sang, le sperme et les sécrétions cervico-vaginales sont les trois liquides biologiques contenant le VIH en quantité importante. Les fortes concentrations se retrouvent dès les premiers instants de l'infection et dans les phases tardives de la maladie[8].

La susceptibilité à l'infection et l'évolution de la maladie dépendent de trois facteurs principaux : les facteurs viraux qui déterminent la réplication et l'habileté du virus à échapper aux défenses de l'hôte ; les facteurs cellulaires qui modulent la réponse immunitaire innée, la réponse immunitaire adaptative à l'infection ainsi que l'entrée du virus ; et la machinerie cellulaire qui intervient dans la production de nouvelles particules virales. Ainsi la vitesse à laquelle les patients infectés progressent vers le stade sida s'explique par la combinaison de ces différents facteurs[16].

Le VIH a été découvert pour la première fois aux Etats-Unis d'Amérique, mais cet Etat demeure toujours le plus affecté parmi les pays les plus industrialisés dans le monde. Les trois quart des nouvelles infections aux Etats-Unis sont des hommes et la plupart d'entre eux sont des homosexuels. Le nombre de femmes qui contractent le VIH par la voie hétérosexuelle est en baisse et la transmission mère-enfant est presque éliminée.

En Europe occidentale, la situation du SIDA est diverse. La transmission du VIH par la voie hétérosexuelle augmente lentement ces dernières années et de nombreuses infections ont été retrouvées chez les immigrants de l'Afrique au Sud du Sahara. L'Europe de l'Est est la plus touchée par cette pandémie avec une infection sévère des usagers de drogues injectables ; les pays les plus infectés sont l'Etat fédéral de la Russie et l'Ukraine.

Parmi les pays en voie de développement, l'Afrique au Sud du Sahara compte 68% des personnes infectées par le VIH dans le Monde et 76% de ces personnes sont morts du Sida. L'Afrique du Sud compte à elle seule 5 millions de personnes infectées donc 10% de la population générale. En 2008, environ 61% des personnes infectées par le VIH en Afrique étaient des femmes et presque 90% des enfants infectés par le VIH vivaient en Afrique.

En dehors de l'Afrique, les régions les plus affectées sont les Caraïbes qui ont une prévalence d'environ 1% avec une plus grande infection par voie hétérosexuelle. Au Sud et au Sud-Est asiatique, la prévalence de l'infection au VIH est plus élevée dans certains groupes sociaux à risque comme les usagers de drogues injectables, les prostituées et leurs clients ainsi que les homosexuels[8].

I.1.3 Les récepteurs membranaires du virus

L'entrée du virus dans la cellule hôte fait intervenir deux étapes essentielles. La première étape implique une forte affinité de liaison entre la gp120 du virus et la molécule de CD4 qui est présente à la fois chez les macrophages et les lymphocytes T CD4. Les molécules CD4 sont donc les récepteurs principaux dans l'entrée du virus dans la cellule hôte[17]. Ces molécules font partie de la superfamille des immunoglobulines et en plus de servir de récepteur pour le VIH-1 et 2, ils sont indispensables à la fonction des lymphocytes T helper[18].

La seconde étape, favorisée par l'interaction CD4-gp120, fait intervenir des corécepteurs qui sont différemment exprimés par les deux types cellulaires. Cette seconde étape favorise la fusion de la membrane cellulaire avec la membrane virale[19].

Les corécepteurs impliqués dans l'entrée du virus dans la cellule hôte sont de petites molécules appartenant à la superfamille des G-protéines. Ce sont des récepteurs de

chémokines qui sont impliqués dans les réactions inflammatoires[19]. Principalement, nous avons les CXCR4, CCR5 et CCR3 ; les CCR5 sont les corécepteurs majeurs du VIH[17]. Bien que la plupart des lymphocytes T CD4 expriment essentiellement le corécepteur CXCR4, les macrophages et les premiers lymphocytes infectés par le virus expriment à la fois les corécepteurs CXCR4 et les CCR5[19]. Les virus qui utilisent préférentiellement les corécepteurs CCR5 sont appelés virus M-tropic. Ils prédominent durant la phase asymptomatique de l'infection et infectent les macrophages et les lymphocytes T CD4. Par contre chez la plupart des patients, aux stades avancés de la maladie nous avons une prédominance des virus qui utilisent préférentiellement les corécepteurs CXCR4. Ces virus sont appelés virus T-tropic qui sont inefficaces dans l'infection des macrophages et qui infectent principalement les lymphocytes T CD4. L'émergence de ces derniers entraîne une accélération de la déplétion des lymphocytes T CD4 et une progression rapide du sujet infecté vers le stade SIDA.

Les CCR3 sont surtout impliqués dans l'infection des macrophages résidants du système nerveux central par les virus M-tropic [17]. En effet, du fait de leur habileté de passer du sang vers les tissus, les macrophages infectés sont les principaux agents dans la transmission du virus aux autres tissus et organes dont le cerveau. Toutefois, l'aptitude du virus à rentrer et à se répliquer dans la cellule hôte dépend du type de virus, de l'utilisation des corécepteurs par la cellule, des facteurs intervenant après l'entrée du virus qui influencent et restreignent la réplication virale, du stade de différenciation cellulaire et du niveau d'expression des CD4 chez les monocytes[20],[19].

I.1.4 La réplication du VIH

La première étape du cycle de réplication du VIH-1 est sa fixation grâce à sa gp120 sur le récepteur CD4. Cette fixation est suivie de la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cytoplasmique cellulaire ; le core entre dans la cellule et libère les deux molécules d'ARN génomique associées à la RT. La réplication du VIH se caractérise donc par une interaction dynamique entre le virus et la cellule hôte. Le VIH exploite la machinerie cellulaire pour sa propre réplication[15, 16, 21]. En effet, après l'entrée du virus dans la cellule hôte, grâce à un ARNt-lysine comme amorce, la RT synthétise un brin d'ADN complémentaire de l'ARN viral puis une activité associée, la RNase H, dégrade le brin d'ARN pendant qu'un deuxième brin d'ADN se constitue. On aboutit ainsi à un ADN bicaténaire qui va être circularisé puis intégré (grâce à l'intégrase) dans le génome cellulaire pour donner le provirus. Cette étape est très importante dans la réplication du virus[15, 22].

Le provirus est constitué de trois gènes de structure : gag, pol et env codant respectivement les protéines p24 et p18, la RT et ses activités associées (polymérase, RNase H, intégrase, protéase) et les glycoprotéines d'enveloppe gp41 et gp120. Une fois intégré, le virus devient hautement dépendant de son hôte pour sa réplication, la transcription et la traduction de ses gènes ; mais tous ces mécanismes sont régulés par des signaux viraux qui sont appelés protéines régulatrices. Pour que de nouvelles particules virales se forment il faudra que se produise une transcription active qui va donner tous les éléments nécessaires à la construction des particules virales. Il faudra donc que l'équilibre se déplace vers le sens d'une synthèse des protéines de structures aux dépend de celles régulatrices.

Les protéines régulatrices sont présentes dans les cellules infectées et jouent un rôle essentiel pour maintenir un état de latence caractérisé par l'absence de réplication du virus (protéine nef), ou au contraire favoriser le réveil et la dissémination du virus, donc l'évolution vers la maladie (les protéines tat, vif et surtout rev). Dans ce dernier cas, des protéines virales seront synthétisées et les particules virales pourront s'assembler et sortir de la cellule par bourgeonnement. Pour constituer des particules virales, il faut donc du RNA (génomique) et des protéines codées par les gènes gag, pol et env. Les petites protéines régulatrices codées par les gènes tat, rev, nef, vif (etc.) du DNA proviral et synthétisées au niveau de la cellule hôte ne sont pas des constituants du virus mais jouent un rôle de régulation[1].

Certains facteurs exogènes (provenant de l'environnement), cellulaires et viraux favorisent la réplication du virus en activant le système immunitaire. Ainsi la présence des microorganismes dans l'environnement qui stimulent en permanence le SI, les cytokines pro-inflammatoires et l'activation du SI induit par les glycoprotéines de l'enveloppe virale activent la réplication du virus[15].

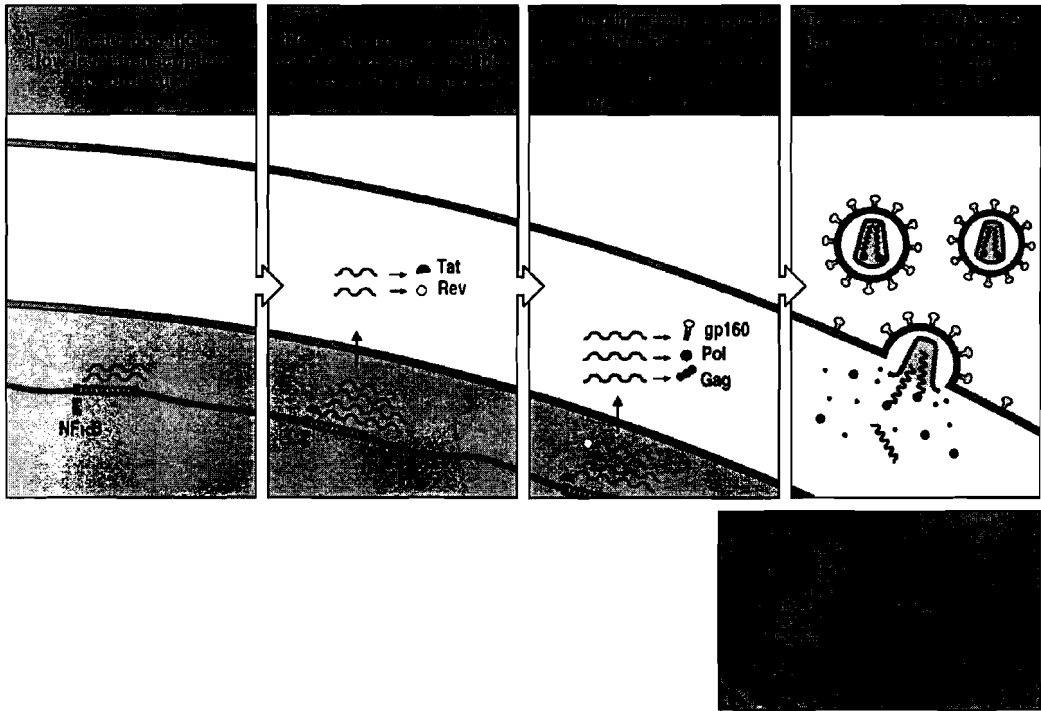


Figure 11-25 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Fig.3 : schéma de la réplication du VIH [23]

I.1.5 Physiopathologie de l'infection au VIH

L'infection au VIH est par définition associée à la déficience progressive du Système Immunitaire. Cette déficience immunitaire est caractérisée par la diminution de la réponse immunitaire adaptative et l'augmentation de la susceptibilité aux infections dites opportunistes. Cette incapacité progressive du Système Immunitaire à répondre efficacement aux différentes infections est associée à une activation chronique du système immunitaire chez le sujet infecté[24]. Les effets cytopathogènes du virus sur les cellules du système immunitaire, les mécanismes conduisant à une immunodéficience grave et qui influencent l'évolution de la maladie, ont été très largement étudiés[12]. Mais, les avancées observées depuis la découverte de la pandémie du SIDA n'ont pas permis jusque là de clarifier complètement les causes de l'immunodéficience associée à l'infection au VIH. Plusieurs hypothèses ont donc été développées pour expliquer les troubles de fonctionnement de l'organisme dus à l'infection. Ces différentes hypothèses tentent d'expliquer le processus par lequel on assiste à une diminution progressive du nombre de CD4 chez les sujets infectés en absence de traitement aux ARV[24].

Le VIH infecte les cellules T CD4, dans une moindre mesure les macrophages et les cellules dendritiques, l'activation de ces cellules entraîne une augmentation de la production virale et donc la destruction cellulaire[25]. En dehors de tout traitement, les manifestations

cliniques de l'infection au VIH résultent de la destruction des lymphocytes T CD4. La réduction de ces cellules atteint au cours de l'infection un niveau critique tel que des agents infectieux inhabituels sont à l'origine des infections appelées infections opportunistes caractéristiques du stade Sida. Mais, la progression vers le stade Sida n'est pas inévitable et certaines personnes contrôlent l'infection du VIH pendant de longues périodes sans signes cliniques apparents[8].

Ce déficit du système immunitaire affecte le ratio lymphocytes T CD4/ lymphocytes T CD8, le nombre absolu de CD4 ainsi que le nombre total de lymphocytes. Les symptômes cliniques caractéristiques de l'infection n'apparaissent que lorsque le système immunitaire n'arrive plus à réparer les dommages causés par le virus[26].

L'hypothèse la plus soutenue est que, le dysfonctionnement du Système Immunitaire (SI) consécutif à l'infection au VIH, est dû à l'activation chronique du SI qui contribue à la diminution progressive des lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique et à l'altération de la réponse immunitaire[27]. La déplétion des lymphocytes T CD4 chez les sujets infectés affecte aussi bien les cellules infectées que les cellules non infectées.

Plusieurs mécanismes interviennent dans la destruction des cellules infectées par le VIH. Parmi ces mécanismes on peut citer la destruction de ces cellules par le virus lui-même. Cela s'explique par le fait que la durée de vie moyenne de la majeure partie des lymphocytes T CD4 infectés diminue et se situe entre 12 et 36 heures in vivo. La viabilité de la cellule est compromise par la libération des particules virales qui perturbent l'intégrité et la perméabilité de la membrane cellulaire ; et la Vpu (Viral protein U retrouvé chez le VIH-1 uniquement) qui induit également la perméabilité membranaire et donc la mort cellulaire. En plus, la réplication virale a des conséquences terminales telles que l'accumulation des ADN viraux non intégrés dans le génome cellulaire qui induit la mort de la cellule. Certaines protéines virales telles que Nef, Env et Tat sont impliquées dans l'activation des protéines cellulaires inductrices d'apoptose. La Vpr (Viral protein R qui joue un rôle important dans l'importation du génome virale dans le noyau cellulaire) quant à elle induit l'arrestation du cycle cellulaire au stade G2 et l'apoptose. De même les virus CXCR4-tropic rencontrés dans les stades tardifs de l'infection induisent la formation de syncytium et l'incorporation des cellules voisines. La destruction des cellules T CD4 infectées peut être également le fait de leur lyse par les Natural Killer et les lymphocytes T CD8 spécifiques du Virus. Cependant le virus a développé des mécanismes de résistance pour prévenir ou simplement retarder l'apoptose des cellules infectées[25]. Les réactions auto-immunes de nature humorale ou cellulaire, peuvent également être à l'origine de la destruction cellulaire[24].

Chez les sujets infectés, les lymphocytes T CD4 non infectés peuvent être détruits par deux mécanismes principalement : par l'intermédiaire des protéines virales qui, libérées par les cellules infectées, agissent sur les cellules voisines non infectées et par la mort cellulaire induite par l'activation de la cellule. En effet, les particules virales inactivées ainsi que les protéines virales libérées dans le milieu extracellulaire peuvent avoir des conséquences dramatiques sur les cellules non infectées. Les protéines virales comme le gp 120, Tat, Nef et Vpu induisent la destruction des cellules non infectées[25].

Le virus peut également inhiber la régénération des lymphocytes T CD4 entraînant ainsi une diminution progressive du nombre de ces cellules dans le sang périphérique ainsi que dans l'organisme tout entier[7, 8]. La séquestration de ces cellules consécutive à l'infection au VIH ainsi que la destruction du tissu lymphatique dans les stades avancés de la maladie interviennent dans la diminution des lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique[24].

Enfin les propriétés de la RT participent à la pathogénie du VIH-1. En effet la RT est une enzyme qui commet beaucoup d'erreurs lors de la synthèse de l'ADN bicaténaire. Au cours des cycles de la réplication, des variants génétiques du virus apparaissent chez le sujet infecté. Les mutations portent particulièrement sur le gène env et plus précisément sur la région qui code le segment de gp120 appelé boucle V3. C'est contre cette région que sont dirigés les principaux anticorps neutralisants élaborés par le malade. A la longue les variants viraux échappent à la neutralisation et participent à l'augmentation de la charge virale chez le patient[10].

I.1.6 VIH et cellules de la lignée monocytaire

Le VIH peut se répliquer dans plusieurs types cellulaires ; toutefois, deux types cellulaires majeurs sont infectés par ce virus : il s'agit des lymphocytes T CD4 et les cellules de lignée monocytaire surtout les macrophages[20]. Les monocytes-macrophages sont reconnus comme étant les cibles du VIH au début de l'infection avec une infection subséquente des lymphocytes T CD4. Ces cellules sont infectées via les CD4 mais aussi de façon indirecte. L'infection indirecte fait intervenir des immunoglobulines anti VIH-1 qui vont accrocher leur fragment Fc au récepteur Fc présent à la surface de la cellule, provoquant ainsi un rapprochement virus-cellule puis une internalisation virale et une infection cellulaire[10]. L'infection du macrophage entraîne une inhibition de la phagocytose, du chimiotactisme et de la sécrétion des cytokines. Mais l'investigation sur ce sous groupe cellulaire est difficile du fait de leur accessibilité limitée.

A la différence des lymphocytes T CD4, les macrophages sont plus résistants à l'effet cyto-pathogène du virus ; mieux, ils arrivent à échapper aux défenses du Système Immunitaire de l'hôte. Les macrophages infectés ont une durée de vie beaucoup plus longue que les lymphocytes T CD4 infectés ; ceci s'explique par le type d'interaction qui a lieu entre la cellule et le virus. Chez les lymphocytes T CD4 et d'autres cellules non hématopoïétiques les particules virales se forment au niveau du cytoplasme ; par contre chez les macrophages, les différents composants viraux se rassemblent au niveau d'un endosome. La longévité des macrophages malgré leur infection par le VIH pourrait résulter de ce phénomène. Les cellules demeurent infectieuses pendant plusieurs mois même chez les patients recevant des traitements aux ARV et peuvent infecter les lymphocytes T CD4 lors de la communication de ces derniers avec les macrophages.

Ainsi les macrophages infectés constituent un réservoir du virus et jouent un rôle important dans la pathogénie du VIH parce qu'ils interviennent dans la transmission du virus au début de l'infection, la persistance de l'infection et la dissémination du virus dans l'organisme[19, 20].

I.2. SIDA

I.2.1 Définition des stades cliniques de la maladie

Depuis le début de la pandémie du Sida, plusieurs définitions des différents stades de l'infection au VIH ont été développées. Les objectifs de ces définitions étaient d'aider les cliniciens à poser un diagnostic présomptif, administrer au moment opportun des traitements spécifiques et efficaces aux patients, et permettre aux chercheurs de définir des groupes uniformes de patients pour les études épidémiologiques [26]. En 2006 les experts de l'OMS ont défini des critères cliniques et biologiques de l'évolution de l'infection au VIH et les critères de mise sous traitement ARV[28]. Des stades cliniques ont été donc définis en fonction de la perte du poids et des symptômes cliniques apparents.

Stade clinique 1 ou phase asymptomatique : à ce stade il n'y a pas de perte de poids chez le patient et pas de symptômes cliniques en dehors d'une lymphadénopathie persistante, généralisée. Les patients ne sont mis sous ARV que si le nombre de CD4 est inférieur à 350 cel/ μ l.

Stade clinique 2 ou stade de maladie modérée : il se caractérise par la perte de 5-10 % du poids ; les symptômes caractéristiques sont des lésions ou gerçures autour des lèvres, des exanthèmes, de la varicelle/zona, des infections récurrentes des voies respiratoires

supérieures et les ulcères buccaux. La mise sous un traitement aux ARV n'intervient que si le nombre de CD4 < 200 cel/ μ l.

Stade clinique 3 ou stade de maladie avancée ; il se caractérise par une perte de poids supérieur à 10% et la présence des symptômes comme le muguet, la diarrhée, la candidose vaginal ou une fièvre inexplicée pendant plus d'un mois, des infections bactériennes graves comme la pneumonie, la tuberculose pulmonaire. Les patients à ce stade doivent être tous traités si le nombre de CD4 < 350 cel/ μ l. Cependant si la numération des CD4 n'est pas disponible tous les patients à ce stade doivent être traités.

Enfin, le stade 4 ou stade de maladie sévère : il correspond au stade SIDA. Ce dernier stade se caractérise par un syndrome cachectique lié au VIH et les symptômes cliniques comme le muguet œsophagique, des ulcérations d'herpès simplex, des lymphomes, le sarcome de Kaposi, le cancer du col de l'utérin invasif, une pneumonie à pneumocystis, une tuberculose extra pulmonaire, une méningite à cryptocoque et une encéphalopathie à VIH. Tous les patients au stade 4 répondent aux conditions médicales pour entamer le traitement aux ARV[29].

La classification en stades cliniques est prévue pour les patients dont l'infection par le VIH a été confirmée. Elle doit faire partie de l'évaluation initiale réalisée au cours de la première visite à l'entrée d'un programme de prise en charge et de traitement. Quand la numération des CD4 n'est pas disponible, elle doit être utilisée pour guider les décisions quant à la mise sous prophylaxie par le cotrimoxazole, à la mise sous un traitement aux ARV ou au changement de traitement[30].

Cependant, l'utilisation des techniques moléculaires de quantification de l'ARN viral plasmatique a permis de changer la vision de l'infection au VIH. L'infection est donc caractérisée par l'existence de trois phases : la primo-infection, la phase asymptomatique et la phase d'immunodépression qui est associée au SIDA. Au cours de la primo-infection, le virus se multiplie de façon intensive dans les cellules mononuclées du sang circulant ainsi que celles des ganglions. Après la séroconversion, la multiplication va décroître et le patient rentre dans la phase asymptomatique qui dure plusieurs années et au cours de laquelle la réplication virale est modérée mais permanente. Enfin, nous avons la phase SIDA ; à ce stade, la réplication virale va atteindre de nouveau des niveaux élevés. Dès lors, la détermination de la charge virale plasmatique va être le marqueur principal de pronostic de l'évolution et de suivi thérapeutique d'une chimiothérapie antirétrovirale[10].

I.2.2 Les ARV

Les antirétroviraux sont des molécules "virustatiques" qui inhibent essentiellement l'activité d'enzymes indispensables à la réplication du VIH sans le détruire[2]. Ils améliorent l'état clinique et contribuent à un retour en arrière du stade clinique chez les patients ayant une maladie symptomatique[30]. Mais la prescription optimale des ARV exige la connaissance des molécules, de leurs effets secondaires, des combinaisons thérapeutiques et des conditions exigées pour l'obtention de meilleurs résultats. On distingue plusieurs classes d'ARV réparties en fonction des cibles ; les différentes cibles possibles des thérapies antirétrovirales découlent directement du cycle de réplication du VIH[2] :

➤ Les inhibiteurs de l'entrée du virus dans la cellule : ils agissent en bloquant les corécepteurs du VIH.

➤ Les inhibiteurs de la fusion (IF) bloquent la fusion entre la membrane virale et la membrane de la cellule cible empêchant l'entrée de l'ARN viral dans la cellule ; par inhibition du réarrangement structural de la gp-41 du VIH.

➤ Les inhibiteurs de l'intégrase

Les inhibiteurs de l'intégrase (II) empêchent l'insertion covalente, ou intégration du génome du VIH dans le génome de la cellule hôte par inhibition de l'activité catalytique de l'intégrase

➤ Les inhibiteurs de la reverse transcriptase

Du fait de son rôle important dans la réplication du VIH, la reverse transcriptase est une cible très importante dans le développement des ARV[15]. Les inhibiteurs de la Transcriptase Inverse sont divisés en deux grands groupes : les inhibiteurs nucléosidiques (INTI ou IN) qui bloquent la transcriptase inverse par compétition avec les nucléosides naturels ; et les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI ou INN) qui agissent directement par fixation sur le site catalytique de la transcriptase inverse du VIH-1. Les INNTI sont inactifs sur le VIH-2. Les inhibiteurs de la transcriptase bloquent la transcription de l'ARN viral en ADN, donc l'intégration du génome virale dans le génome de la cellule hôte.

➤ Les inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de la protéase (IP) empêchent l'assemblage des protéines virales nouvellement synthétisées par fixation sur le site catalytique de la Protéase, bloquant ainsi son activité protéolytique. Cela conduit à la production de virions immatures, non infectieux et donc à l'interruption du cycle viral. Ils sont actifs sur les cellules infectées de façon chronique, contrairement aux inhibiteurs de la transcriptase inverse[2].

Les inhibiteurs de l'intégrase, de la fusion et de l'entrée du VIH dans la cellule sont réservés pour des traitements particuliers notamment pour les patients présentant une très forte résistance virale on parle de "salvage therapy" ou "thérapie de sauvetage".

La combinaison des molécules de différentes classes est nécessaire pour contrer la résistance virale qui se développe rapidement au cours de la monothérapie. La réplication du VIH produit plusieurs copies par jour, et puisque la reverse transcriptase est une ADN polymérase dénuée de fonction d'édition ; les mutations sont donc relativement nombreuses. Certaines de ces mutations peuvent être à l'origine des résistances aux ARV. On assiste ainsi à une émergence des souches mutantes qui elles, arrivent à échapper aux traitements[31]. Au Burkina Faso, la combinaison des molécules se fait en tenant compte des résultats des examens biologiques du patient, du sexe, du type de VIH et de l'état physiologique de la femme enceinte[2].

L'objectif idéal du traitement ARV serait de pouvoir prévenir l'infection et guérir les cellules infectées. Mais l'incorporation aléatoire de l'ADN pro-viral au sein du génome de l'hôte rend ceci difficile. C'est donc souvent un contrôle de l'infection qui est recherché, c'est-à-dire un blocage de la réplication virale, l'infection restant latente dans les cellules hôtes[31].

Les molécules disponibles au Burkina Faso pour la prise en charge des patients infectés par le VIH appartiennent à deux grands groupes : les inhibiteurs de la transcriptase reverse et les inhibiteurs de la protéase[2].

I.2.2.1 Les Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI ou IN)

Ce sont les premiers antirétroviraux développés. Ils sont actifs sur VIH-1 et -2. Ce sont des analogues de bases nucléiques qui bloquent la fabrication d'ADN pro-viral. Néanmoins, des résistances sont observées, notamment à cause de la survenue de mutations de la transcriptase inverse. Les principaux médicaments disponibles sont :

➤ **Zidovudine (ou AZT) = Rétrovir®** : C'est un analogue de la thymidine. Comme caractéristiques pharmacocinétiques, nous avons une bonne résorption digestive, une élimination rénale et un passage transplacentaire. Cependant cet ARV induit une toxicité hématologique, et des myopathies mitochondriales.

➤ **Stavudine (d4T)** : c'est un analogue de la thymidine. Les effets secondaires observés avec cet ARV sont les poly-neuropathies périphériques, des pancréatites aiguës, une élévation modérée des transaminases[2].

➤ **Lamivudine (3TC)** : C'est un analogue de la cytidine, elle est généralement bien tolérée et est active sur les souches résistantes à l'AZT. Son association avec l'AZT donne une action synergique sur l'inhibition de la réplication virale. L'élimination est rénale et les effets indésirables sont de faible intensité et transitoires.

Les INTI sont responsables d'une baisse modérée de la charge virale. Leur action est transitoire avec possibilité d'apparition de résistance. Ils sont souvent associés entre eux ou aux inhibiteurs de protéases. Des associations d'INTI ont été développées afin de limiter le nombre de prises de médicaments quotidiennes et de renforcer l'observance : il s'agit du **combivir®** qui est une association de AZT + 3TC.

I.2.2.2 Les inhibiteurs non nucléosidiques de la reverse transcriptase (INNTI ou INN) et leurs effets secondaires

➤ **Nevirapine**

Ce médicament présente une toxicité cutanée et des hépatites d'hypersensibilité.

➤ **Efavirenz**

La prise de cet ARV entraîne dans plus de 50% des cas une atteinte du système nerveux central et des éruptions cutanées.

I.2.2.3 Les inhibiteurs de protéases (IP) et leurs effets secondaires

Kaletra

Le Kaletra est une association de deux médicaments anti-VIH qui sont : le Lopinavir et le Ritonavir. Les effets secondaires les plus rencontrés sont des troubles digestifs.

La combinaison thérapeutique recommandée est l'association de 3 ARV (trithérapie) de deux classes différentes.

Pour un traitement de première ligne nous avons :

- Combinaison « 2IN + 1INN » indiquée uniquement en cas d'infection par le VIH-1
- Combinaison « 2IN + 1IP » indiquée en cas d'infection par le VIH-2, de coïnfection VIH-1 et 2 ou dans certaines conditions avec le VIH-1 tel que le changement de protocole.

Le traitement de première ligne s'applique aux patients qui n'ont jamais reçu de traitement ARV. La deuxième ligne est indiquée en cas d'échec thérapeutique avec la première ligne. Le passage de la première ligne à la deuxième ligne fait appel à un nouveau protocole thérapeutique associant au moins trois nouveaux médicaments.

Tous ces médicaments sont éliminés par voie rénale. Sachant que des cas d'insuffisance rénale sont assez fréquents chez les PVVIH du fait de la possibilité de néphropathie induite par le VIH, la posologie doit donc être ajustée suivant chaque patient [31].

I.2.2.4 L'observance des traitements ARV

L'observance consiste à prendre des médicaments selon la dose prescrite, au moment indiqué et de la manière prescrite. C'est un déterminant essentiel de l'efficacité du traitement ARV. Tout ARV pris incomplètement ou irrégulièrement (oubli occasionnel, prise groupée, arrêt partiel ou total plus ou moins long) favorise l'échec thérapeutique.

A cet effet les structures de prise en charge doivent développer des stratégies d'aide à l'observance du traitement afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles en terme d'amélioration de l'état de santé des patients. Les activités d'aide à l'observance avant la mise sous traitement consistent en des séances d'éducation thérapeutique de groupe et en des entretiens personnalisés visant à renforcer les connaissances et les capacités du malade pour qu'il soit « moteur » de son propre traitement. L'observance est une variable dynamique, très influencée par les événements survenant dans la vie du patient surtout dans le cadre du traitement ARV (traitement à vie). L'évaluation de l'observance se fait pour chaque patient en fonction du nombre de comprimés oubliés. Ainsi elle peut être soit Bonne, Moyenne ou Faible.

Chapitre II : GENERALITES SUR LA CYTOMETRIE DE FLUX

II.1. Historique

Les méthodes d'analyse des cellules sont essentielles pour la compréhension des fonctions cellulaires ainsi que les pathologies des cellules. La CMF est née du besoin d'automatisation du comptage des constituants cellulaires du sang. Les origines de la CMF sont anciennes puisque c'est en 1934 que Moldavan conçut le premier appareil avec lequel il réalisait des numérations cellulaires en faisant défiler les cellules dans un fin capillaire où elles étaient vues par un capteur photo électrique[32]. En 1954, Wallace Coulter développa un instrument capable de déterminer la taille et le nombre absolu des cellules[33]. Dans les années 1970, les chercheurs de Los Alamos et de Stanford associaient des méthodes de mesure individuelle du volume ou de la fluorescence de cellules entraînées par un flux avec des méthodes électrostatiques permettant le tri cellulaire dans des conditions vitales. La diffusion de la lumière compléta rapidement la liste des propriétés capables de discriminer plusieurs types cellulaires[32]. Le développement de l'informatique et de la technologie du Laser, la production des anticorps monoclonaux ainsi que l'utilisation accrue des fluorochromes ont conduit à une explosion des activités impliquant la CMF deux décennies plus tard[34]. Le premier cytomètre commercial fut conçu par le Pr Wolfgang Göhde et son équipe en 1969[35]. L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit donc à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes[32].

II.2. Définition

La cytométrie est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une particule, habituellement d'une cellule en solution lorsqu'elle passe à travers un rayon lumineux. Elle informe sur la taille relative, la granularité ou la complexité ainsi que l'intensité relative de la fluorescence de la cellule[36]. En effet, la cytométrie est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide d'où le nom de cette technique. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de cellules et/ou de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule lorsqu'elle passe à travers le faisceau lumineux d'un Laser.

Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- ❖ aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, et/ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc.

- ❖ aux propriétés optiques induites de fluorescences obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs qui les amplifient puis, ils sont numérisés, traités et stockés par un ordinateur[5].

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées à la distribution des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées[32].

Le type de cytomètre utilisé dans cette étude est le **CyFlow® Counter** de la firme Allemande Partec GmbH.

II.3. Principe

Le principe de la cytométrie est résumé dans la figure 4.

La cytométrie en flux s'applique à des cellules ou des particules en suspension. L'analyse des composants du sang ne pose aucun problème, les cellules étant déjà en suspension. Par contre les tissus cellulaires doivent être dissociés et les agrégats éliminés avant d'être analysés. Les cellules en suspension sont aspirées dans la cellule de mesure, amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon. Une fois en contact avec le rayonnement du Laser une partie de la lumière est dispersée ou absorbée et toute molécule fluorescente présente sur la membrane des cellules émet une fluorescence[32].

En effet, certaines cellules sont fluorescentes naturellement ; pour celles qui ne le sont pas, des fluorochromes peuvent être utilisés. L'un des fluorochromes les plus utilisés est la phycoérythrine ; c'est une protéine de grande taille (environ 240 KDa) photosynthétique contenue dans les algues rouges. Toutefois ces fluorochromes doivent avoir une affinité propre pour un constituant cellulaire donné ou doivent être couplés à un ligand qui peut se fixer à l'antigène ou à la molécule d'intérêt. En exemple, les leucocytes sont différenciables par leur marqueur CD spécifique, pour cela un anticorps spécifique reconnaissant l'épitope en

question est utilisé pour marquer les cellules ; l'anticorps étant lui même lié à une sonde fluorescente donnée (par exemple la Phycoérythrine).

Lorsqu'une cellule ou une particule passe à travers le faisceau lumineux du Laser, les signaux émis sont déviés vers les tubes photomultiplicateurs qui ont pour rôle de les amplifier et de les transmettre aux détecteurs. La spécificité de détection est optimisée par les filtres optiques placés avant le détecteur. Ces filtres ne permettent qu'à une gamme étroite de longueur d'onde de la lumière d'atteindre le détecteur[36]. Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec les propriétés cellulaires. La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule. L'intensité de la fluorescence est fonction du fluorochrome, des « récepteurs cibles » et du Laser. En effet, les substances fluorescentes absorbent la lumière à une longueur d'onde appropriée et la réémet à une longueur d'onde différente. L'isothiocyanate de fluorescéine, le rouge Texas et la phycoérythrine sont les molécules fluorescentes les plus utilisées en analyses biomédicales [34]. Le détecteur produit un signal électronique proportionnel au signal optique reçu [32]. Les signaux électroniques résultant sont numérisés, et les données sont stockées, analysées et affichées sous forme de données électroniques. Le résultat final est une information quantitative et quantitative sur l'ensemble des cellules analysées [5].

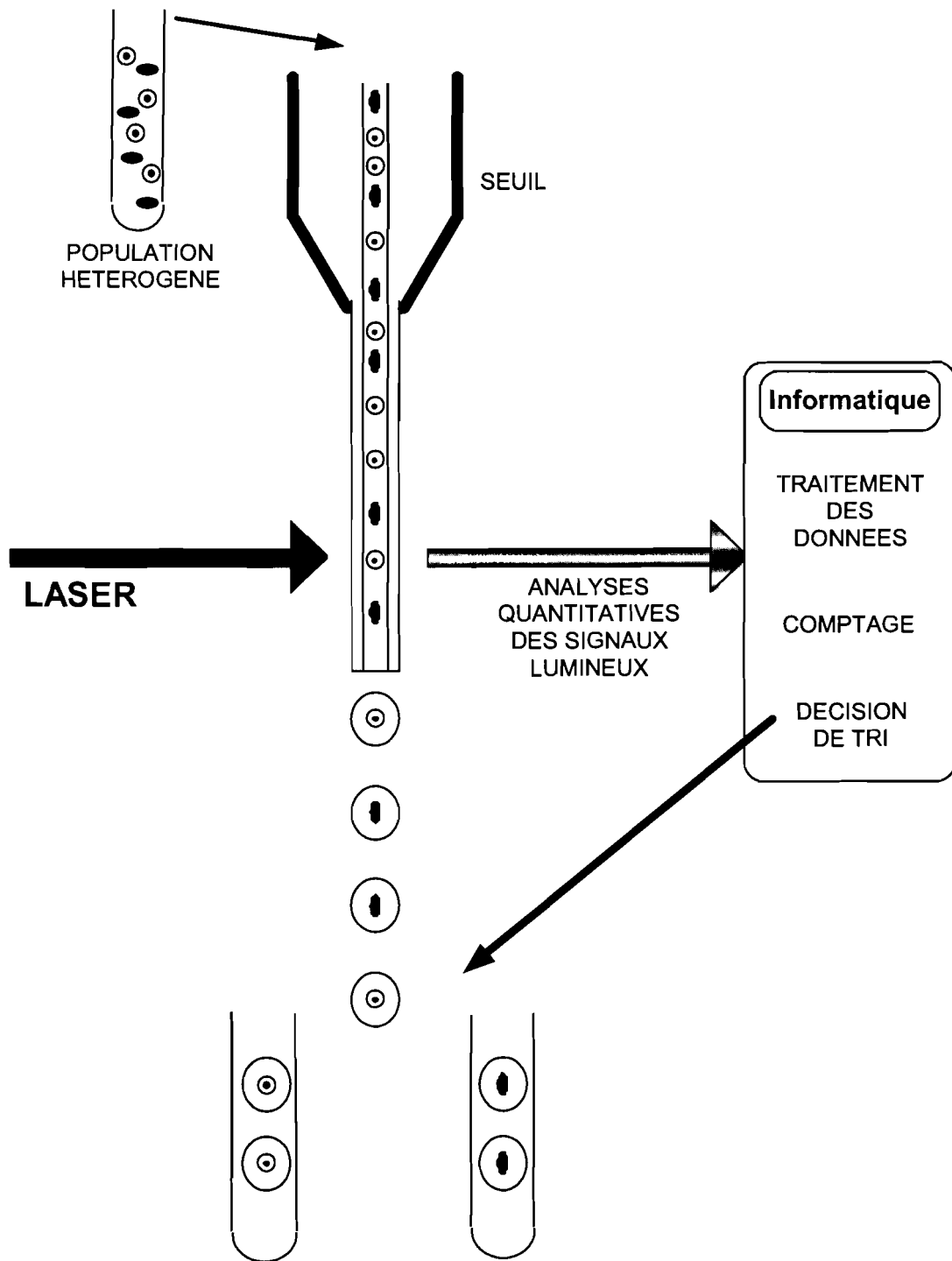


Fig.4: Schéma de fonctionnement d'un CMF[32].

Les composants essentiels du cytomètre en flux

Le cytomètre en flux est un ensemble constitué de 3 systèmes dont le système fluïdique, optique et électronique.

II.3.1 Le système fluïdique

Le système fluïdique permet de transporter les particules en suspension dans un étroit flux laminaire afin d'être excitées par un ou plusieurs faisceaux lumineux[5]. Il comprend la cellule de mesure qui est le principal élément du système. Cette cellule est constituée d'un capillaire formé dans un bloc de quartz (350 x 200 μm pour le Cyflow Counter de PARTEC) qui permet un transport laminaire de l'échantillon dans un flux de liquide de gaine. Le système fluïdique utilise également un régulateur de pression d'air qui assure la stabilité des opérations. Il s'agit d'une Pompe à vide intégrée (400 mbar pour le Cyflow Counter de PARTEC). Le régulateur de pression contrôle aussi la vitesse d'injection de l'échantillon en changeant la pression relative du sheath fluid[36] qui assure l'alimentation de l'ensemble du système en liquide de gaine qui s'écoule vers la cellule de mesure[32]. L'injection est assurée par une seringue à injection haute précision qui est contrôlée par l'ordinateur et qui permet d'injecter l'échantillon sans risque de contamination. La vitesse d'injection de l'échantillon est ajustable entre 0,2 et 20 $\mu\text{l/s}$. Lorsque l'échantillon pénètre dans la cellule de mesure, celui-ci est entraîné par le liquide de gaine dans un flux hydrodynamique. Cette injection permet de focaliser les particules dans un flux très étroit au point de rencontre avec la source d'excitation lumineuse (Laser) tout en minimisant les risques de bouchage du capillaire. Il faut au moins 840 μl de l'échantillon pour le comptage volumétrique absolu et le comptage en pourcentage mais le volume peut atteindre 1600 μl . Pour les leucocytes et la plupart des cellules de mammifère, le sheath fluid est une solution tampon de sels de phosphate[37].

II.3.2 Le système optique

Le système optique d'un cytomètre en flux comporte un ou plusieurs Lasers, les détecteurs, les filtres et les lentilles forment et focalisent le rayon lumineux sur la cellule de mesure. Le nombre de Lasers utilisés en cytométrie est variable. Mais, il est important de connaître la longueur d'onde d'excitation du Laser dans le système parce que cela détermine le type de fluorochrome qui peut être utilisé pour marquer les cellules ou les molécules. L'argon gazeux est généralement utilisé comme Laser. L'énergie lumineuse produite par ce Laser est émise à 488nm. Différents fluorochromes absorbent à 488nm et émettent la lumière à une longueur d'onde de 535 nm dans le vert, 585 nm dans l'orange et 600 nm dans le rouge.

Les différentes lumières émises par les fluorochromes excités peuvent être discriminées par les filtres placés avant les détecteurs[37]. Les filtres optiques permettent la transmission de certaines longueurs d'ondes et l'absorption du reste de la lumière émise[34],[37]. Le nombre de Lasers, de filtres optiques et de détecteurs déterminent la capacité d'analyse multiparamétrique du cytomètre.

Le **CyFlow® Counter**, est équipé d'un laser vert solide NdYAG (30 mW à 532 nm), de trois détecteurs et de trois filtres optiques pour les trois paramètres optiques (side scatter (SSC), fluorescence orange (FL2) et rouge (FL3)). Chaque paramètre est équipé d'un tube photomultiplicateur intégré. Le photomultiplicateur collecte les différentes longueurs d'onde de la lumière et génère une impulsion électronique. L'amplitude du signal émis est proportionnelle au nombre de photons libérés.

Différents signaux sont donc émis par les cellules lors de l'analyse :

➤ **La lumière diffusée (light scatter)** : les cellules traversent le faisceau lumineux à l'intérieur du capillaire au point de rencontre avec le laser, cela donne lieu à un signal de lumière diffusée caractérisant chaque cellule. L'intensité des signaux diffusés vers l'avant (FSC) est représentative de la taille de la cellule. Les petites cellules génèrent de très faibles signaux et les cellules de tailles importantes génèrent de forts signaux. Les signaux diffusés à 90° (SSC) informent sur la "granularité" ou la complexité de la cellule. Les cellules ayant une forte granularité génèrent un fort signal SSC car la composition du cytoplasme représente un important index de réfraction [5]. La membrane cellulaire, le noyau ainsi que les granules présents dans la cellule influent sur la diffusion de la lumière. En se basant sur les caractéristiques du light scatter les leucocytes peuvent être identifiés et énumérés dans une population hétérogène.[37]

➤ **Signal fluorescent** : la fluorescence apparaît lorsqu'une molécule, excitée par un signal lumineux, à une longueur d'onde donnée, reprend son état initial en émettant un signal lumineux à une longueur d'onde supérieure [5]. En effet, le fluorochrome absorbe l'énergie du Laser et réémet l'énergie absorbée par vibration et dissipation de la chaleur avec émission de photons d'une longueur d'onde plus élevée[32]. Les cellules peuvent donc être différenciées en sélectionnant un épitope spécifique qui sera marqué par des anticorps couplés à une molécule fluorescente.

II.3.3 Le système électronique

Le système électronique permet le traitement du signal. Il est muni d'un amplificateur et d'un convertisseur. Ceux-ci permettent d'amplifier et de convertir le signal lumineux

détecté en un signal électronique qui peut être traité par l'ordinateur intégré d'une imprimante avec un écran tactile couleur. Le système électronique permet l'acquisition des données en mode mono ou multiparamétrique, leur visualisation ainsi que le contrôle de l'appareil. Le logiciel permet le traitement, le classement des résultats sous forme de fichier et la sauvegarde de toutes les variables d'une mesure telles que les valeurs de Gain, du speed et du seuil de détection ou LL[5].

II.4. Quelques applications de la cytométrie en flux

La CMF a facilité la compréhension du SI, la connaissance des récepteurs et les cytokines impliquées dans la régulation de l'immunité cellulaire ainsi que l'effet du changement de l'expression de ces cytokines sur l'activation et la différenciation cellulaire. Les progrès récents sur la disponibilité des fluorochromes, des réactifs, de l'instrumentation et de logiciels ont fait de cette technologie une alternative pour plusieurs laboratoires.

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la CMF. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle des cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées. L'association de l'immunofluorescence et de la cytométrie en flux est devenue un élément essentiel dans l'étude des systèmes biologiques, surtout dans la discrimination entre cellules d'une population hétérogène. En effet, l'utilisation des anticorps monoclonaux, dirigés contre des composants membranaires spécifiques, permet de distinguer des sous-populations lymphocytaires.

En cancérologie, la détection de la cellule pathologique est l'application la plus développée. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale par rapport aux cellules normales ; ce qui permet de déterminer la prolifération de la tumeur.

La CMF offre également une méthodologie rapide et simple pour l'analyse du cycle cellulaire. Elle permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues. Elle permet aussi de voir la présence de cellules avec des contenus anormaux d'ADN[32].

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

I.1. Zones d'étude et échantillonnage

L'étude a été réalisée à Ouagadougou au sein du laboratoire du CICDOC. Elle a porté sur des personnes infectées par le VIH, suivies au dans les associations membre du CICDOC Ouaga. Les patients inclus dans cette étude présentaient un profil de cytogramme avec une zone de chevauchement entre les monocytes et les lymphocytes T CD4. Les patients qui remplissaient les critères ont été enrôlés au fur et à mesure de leur passage pour le suivi biologique.

I.2. Collecte des données

Pour les patients qui sont inclus dans l'étude nous avons prélevé 5 ml de sang dans un tube EDTA. A partir de cet échantillon de sang nous avons effectué des analyses en utilisant la méthode de numération des CD4 en valeur relative c'est-à-dire en pourcentage de CD4 par rapport aux lymphocytes totaux.

Nous avons utilisé les réactifs suivants : les anticorps monoclonaux anti CD4 couplés à la phycoérythrine et les anticorps monoclonaux anti CD45 couplés à la phycoérythrine-Dy647. Les anticorps anti CD45 permettent de marquer les leucocytes en général étant donné que les récepteurs membranaires CD45 sont des antigènes communs des leucocytes et les anticorps anti CD4 permettent de marquer spécifiquement les lymphocytes T CD4. Les cellules sont séparées en fonction de leur niveau de fluorescence ainsi que de leur granularité. Le profil des leucocytes des patients a permis d'identifier ceux qui ont été retenus dans l'étude. Nous avons ensuite mené des investigations sur l'état clinique des patients ainsi que sur les traitements suivis.

I.3. Equipements et réactifs

Tous les échantillons ont été analysés par le **CyFlow® Counter** de la firme PARTEC. Notre choix à porter sur cet appareil parce que ce cytomètre offre l'avantage de faire en plus de la numération des lymphocytes T CD4 en valeur absolue, la numération en pourcentage et permet d'avoir la numération des différentes sous populations leucocytaires. En effet l'expression en valeur relative est surtout recommandée chez les enfants car elle rend mieux compte de l'évolution de l'état d'immunodépression du patient. Le nombre de leucocytes diminue avec l'âge chez les enfants et il est souvent difficile dans le cadre du suivi biologique de discriminer entre l'immunodépression due au VIH et une baisse physiologique des

leucocytes associée à l'âge. L'expression en valeur absolue est fréquemment utilisée chez les patients adultes, mais de nouvelles directives recommandent l'utilisation du pourcentage de CD4[38].

L'utilisation de ce cytomètre nous a permis, de faire simultanément la numération des lymphocytes T CD4, celle des monocytes et d'apprécier le profil des leucocytes de chaque patient.



Fig.5 : CyFlow® Counter[5]

La numération volumétrique des CD4 effectuée avec le CyFlow® Counter de PARTEC se fait par un mono marquage c'est-à-dire un marquage qui utilise un seul type d'anticorps : les anticorps anti CD4 couplés à la phycoérythrine. Ceci permet la séparation des leucocytes en deux groupes : celles dites positives qui expriment les molécules de CD4, qui sont donc marquées, et celles dites négatives qui n'expriment pas les molécules de CD4, qui ne sont pas marquées. Le résultat avec le mono marquage se présente selon le schéma de la Fig.6.

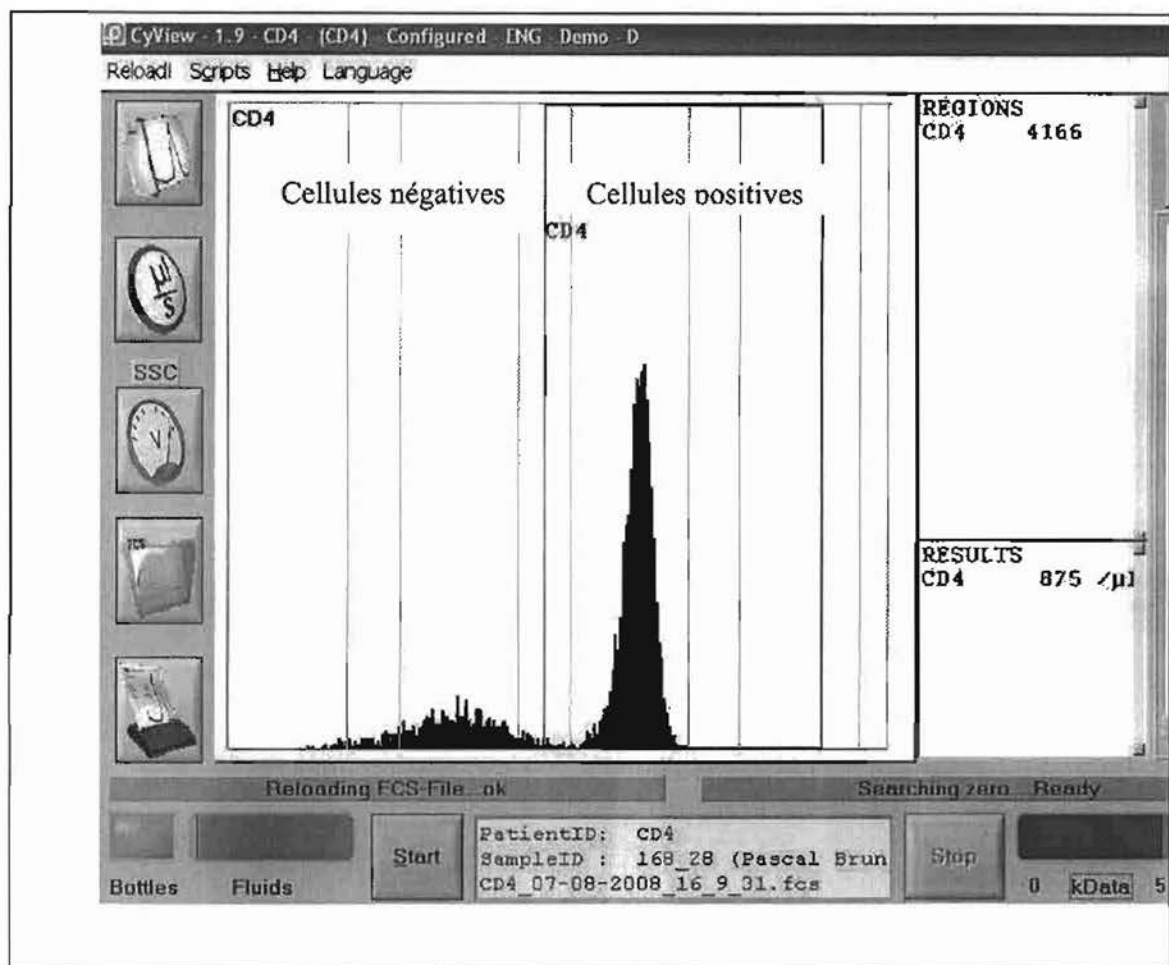


Fig.6 : Analyse de cytométrie par le protocole CD4 simple [5]

La numération des CD4 en pourcentage que nous avons utilisée dans cette étude se fait par un double marquage qui utilise deux types d'anticorps : les anticorps anti CD4 et les anticorps anti CD45. Ce double marquage permet de différencier les leucocytes en quatre populations cellulaires à savoir : les granulocytes, les monocytes, les lymphocytes T CD4 et les autres lymphocytes. Pour une parfaite réalisation des analyses nous avons utilisé un certain nombre de réactifs.

Il s'agit :

- Du Count Check Beads : ce sont des billes couplées à des fluorochromes qui jouent le rôle de fluorescence standard pour le contrôle régulier du bon fonctionnement du cytomètre.



Fig.7: Count Check Beads (Photo de Esther HIEN)

- Des anticorps monoclonaux anti CD4 couplés à la phycoérythrine
- Des anticorps monoclonaux anti CD45 couplés également à la phycoérythrine.
- Des Buffer 1 et 2



Fig.8: Kit CD4% [5]

- Du détergent de couleur verte (Cleaning solution),
- De la solution de Décontamination de couleur violette,
- Du sheath fluid,



Fig.9: Decontamination solution and cleaning solution (Photo de Esther HIEN)

Le cytogramme obtenu dans ce second cas se présente ainsi qu'il suit :

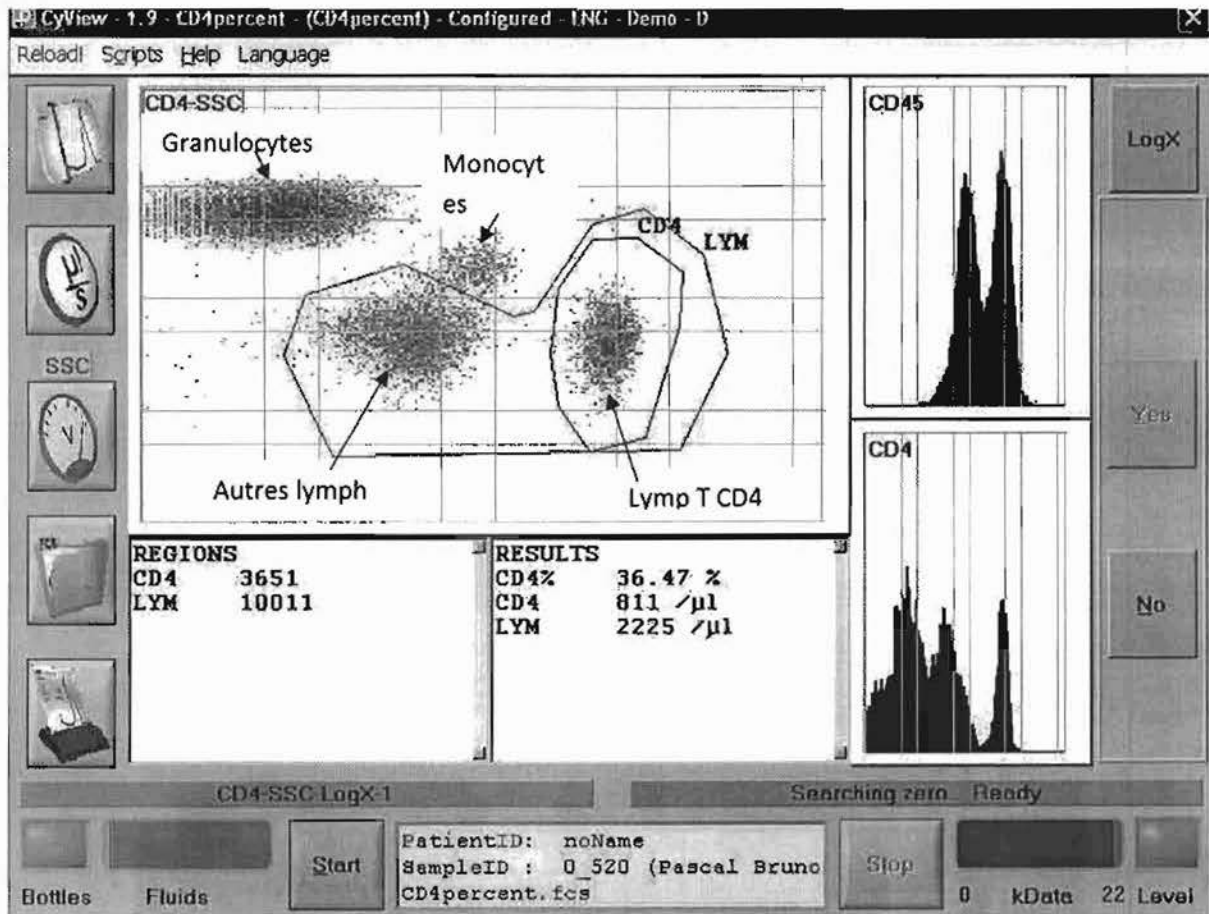


Fig.10 : Analyse de cytométrie par le protocole CD4% [5]

La correspondance entre la valeur absolue et le pourcentage des lymphocytes T CD4 est la suivante chez l'adulte :

- $CD4 \geq 500 \text{ cel}/\mu\text{l} = CD4\% \geq 29$
- $200 \geq CD4 < 500 \text{ cel}/\mu\text{l} = 14 \geq CD4\% \leq 28$
- $CD4 < 200 \text{ cel}/\mu\text{l} = CD4\% < 14$ [10]

I.4. Matériel biologique et traitement de l'échantillon

I.4.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est le sang des sujets infectés par le VIH-1 et/ou le VIH-2 prélevé sur EDTA. 5 ml de sang veineux est prélevé, en général au pli du coude, dans un tube contenant un anticoagulant qui est l'EDTA. Le tube de sang est conservé au frais si

l'analyse ne se fait pas immédiatement. Il n'est pas nécessaire pour le patient d'être à jeun et il n'y a pas de précaution particulière que le patient doit observer.

I.4.2 Traitement de l'échantillon

La procédure de préparation de l'échantillon en vue de l'analyse se fait en plusieurs étapes :

- Ajouter 10 μL de l'anticorps anti CD4 dans un tube PARTEC
- Ajouter 10 μL de l'anticorps anti CD45 dans le tube PARTEC
- Ajouter 20 μL de sang total prélevé dans un tube EDTA après avoir bien homogénéisé
- Mélanger bien et doucement
- Incuber 15 minutes à l'obscurité et à la température ambiante
- Ajouter 400 μL du premier diluant dans le tube
- Ajouter 400 μL du second diluant dans le tube. Lire l'échantillon avant les dix minutes qui suivent.

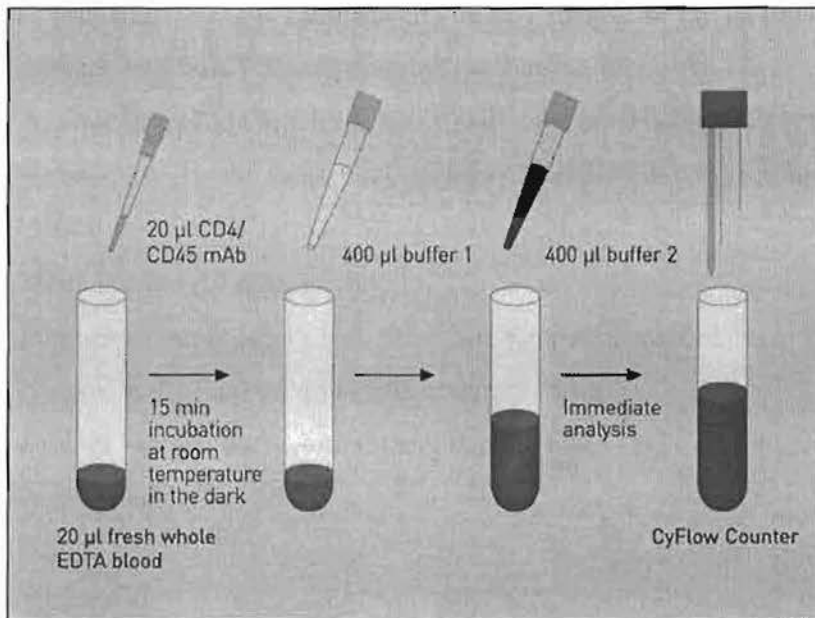


Fig.11 : Préparation des échantillons [5]

NB : L'échantillon peut être conservé entre 2 et 8° Celsius pendant 48h après ajout du premier diluant. Mais pour éviter toute contamination extérieure, il faut prendre soin de boucher le tube.

I.5 Contrôle de qualité

Le contrôle de la qualité des analyses effectuées au laboratoire s'effectue à deux niveaux :

➤ Qualité du prélèvement

Pour le prélèvement il n'y a pas de dispositions particulières que le patient doit prendre. Nous faisons les prélèvements dans des tubes EDTA. Chacun des tubes est retourné délicatement 6 à 8 fois (mais sans agiter) pour répartir de façon homogène l'anticoagulant contenu dans le tube. Si l'analyse n'est pas immédiate les prélèvements sont conservés à 4°Celsius. La qualité des résultats de l'analyse est caution à la qualité du prélèvement.

➤ Qualité de l'analyse

Il existe deux types de contrôle de la qualité des résultats fournis par le cytomètre utilisé dans cette étude. Un contrôle interne et externe au laboratoire.

Le contrôle interne se fait quotidiennement en utilisant des billes calibrées marquées par des fluorochromes pour vérifier l'alignement du Laser donc la spécificité de l'analyse qui sera effectuée. Pour le contrôle interne il s'effectue ainsi qu'il suit :

- Nous plaçons sur le support échantillon un tube contenant 850 µl de *Count Check Beads* et nous appuyons sur le bouton Start afin de démarrer l'aspiration.
- Nous attendons jusqu'à ce que l'aspiration et le cycle de nettoyage s'arrêtent automatiquement. Les données peuvent ensuite être sauvegardées et imprimées.
- Alors nous comparons la valeur de la mesure des *Count Check Beads* affichée sur le flacon à celle indiquée sur la machine, cette valeur doit être conforme à la valeur indiquée sur le flacon à $\pm 10\%$.

Le contrôle externe est réalisé périodiquement par une société Allemande dénommée German Society for Clinical Chemistry and laboratory Medicine, qui est un institut de référence en bio-analyse pour assurer le contrôle continu des appareils. Il consiste à expédier au laboratoire, un pool de cellules stabilisées que nous analysons pour plusieurs paramètres et à une fréquence donnée. Ce contrôle a pour objectif d'assurer la fiabilité, le perfectionnement des analyses réalisées par notre laboratoire. Ceci permet au laboratoire de vérifier le bon fonctionnement du Cytomètre.

I.6 Analyse des données

Une base de données sur Excel 2007 a été établie à partir de toutes nos données : profil du cytogramme, nombre de monocytes et de lymphocytes T CD4 de chaque patient inclus dans l'étude ainsi que toutes les informations recueillies sur l'individu échantillonné. Cette base de données a été ensuite importée sur le logiciel d'analyse de données SPSS 12.0 ; à partir de ces données importées sur le logiciel SPSS qui signifie « Statistical Package for the Social Science ». C'est un logiciel complet qui permet de faire des analyses statistiques. Les différentes analyses ont été donc effectuées sur le logiciel SPSS.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Caractéristiques sociodémographiques des patients

Les patients inclus dans cette étude ont leur âge compris entre 18 et 60 ans. La répartition en tranche d'âge montre que 93,4% des patients se trouvent dans la tranche d'âge de 15 à 49 ans et 6,6% ont leur âge supérieur ou égal à 49 ans. Ceci montre que la population sur laquelle à porter l'étude est constituée essentiellement des individus jeunes âgés de 15 à 49 ans.

Tableau 1 : Catégories d'âge des patients

	Pourcentage	Pourcentage cumulé
[15,49[93,4	93,4
≥ 49	6,6	100,0
Total	100,0	

Tous les patients qui ont été inclus dans cette étude sont tous de la ville de Ouagadougou. La répartition en fonction du sexe des patients montre que 73.7% des patients sont de sexe féminin. Cette proportion s'explique d'une part par la susceptibilité des femmes à l'infection. Selon une publication de l'OMS en Novembre 2009 portant sur « Genre et VIH », les femmes sont plus susceptibles d'être infectées par le VIH au cours des rapports sexuels que les hommes en raison des facteurs biologiques. En effet, les zones de muqueuses exposées durant les rapports sexuels sont plus étendues chez les femmes que chez les hommes. Une plus grande quantité de fluide est transférée par l'homme vers la femme que dans le sens inverse et les fluides sexuels transmis par les hommes ont une plus forte teneur en virus. Ensuite les micros déchirures des tissus du vagin (ou du rectum) qui peuvent être causées par la pénétration sexuelle augmentent le risque d'infection de la femme.

En plus des facteurs biologiques ; certains facteurs socioculturels comme les normes de genre qui permettent aux hommes d'avoir plus de partenaires sexuels, les relations sexuelles forcées, la vulnérabilité socio-économique et physique ainsi que le déficit d'information des femmes, les rendent plus susceptible à l'infection[39]. D'autre part, le fort pourcentage des femmes s'expliquerait par le fait qu'elles sont plus disposées à la fréquentation des centres de santé et acceptent plus facilement de se faire dépister. En plus le

dépistage du VIH est recommandé pour toutes les femmes enceintes ce qui permet aux femmes de découvrir leur statut sérologique beaucoup plus vite que les hommes.

Cependant le plus grand nombre des femmes parmi les patients ne signifie pas que le sexe est un facteur de risque quant à l'interférence des monocytes sur la numération des CD4 ; mais cela s'explique par la plus grande susceptibilité des femmes à l'infection au VIH et la disponibilité des femmes au suivi médical.

II.2. Caractéristiques biologique des patients

II.2.1 Répartition des patients en fonction du type de VIH

Parmi les patients inclus dans cette étude, 76% sont infectés par le VIH-1, 22,7% par le VIH-2 et 1,3% par les deux types de VIH. La nette prédominance du HIV-1 par rapport au HIV-2 confirme la représentation du HIV-1 relativement plus importante que celle du HIV-2 dont le foyer se situe pourtant en Afrique de l'ouest. En effet selon une étude menée au Burkina Faso, en 2004 on avait 88% HIV-1 et 12% HIV-2 parmi les sujets infectés[14]. Cette forte prévalence du VIH-1 va entrainer une progression rapide des patients infectés par ce type de VIH vers le stade SIDA que ce dernier est plus virulent que le VIH-2[15].

Tableau 2 : Répartition des patients en fonction du type de VIH

	Pourcentage	Pourcentage cumulé
VIH-1	76	76
VIH-2	22,7	98,7
VIH-1 et 2	1,3	100,0
Total	100,0	

Le croisement du sexe des patients avec le type de VIH montre selon le tableau 3 que 85% des hommes sont infectés par le VIH-1 contre 74.1% chez les femmes. La prévalence du VIH-2 dans cette population montre que le VIH-2 est présent presque deux fois plus chez les femmes que chez les hommes.

Tableau 3 : Tableau croisé sexe du patient/Type de VIH

Type de VIH Sexe	VIH-1	VIH-2	Total
Homme	85%	15%	100%
Femme	74,1%	25,9%	100%
Total	77%	23%	100%

II.2.2 Niveau d'immunodépression des patients

La valeur moyenne des CD4 chez les patients est de 338 cel/ μ l de sang et l'écart type de 212 cel/ μ l. Comme valeurs extrêmes, nous avons 45 cel/ μ l comme la plus petite valeur des CD4 et 1010 cel/ μ l comme la plus grande valeur. La répartition des patients en fonction des niveaux de CD4 montre que 21.1% des patients ont un nombre de CD4 < 200 cel/ μ l, 50% ont un nombre de CD4 compris entre [200-350[et 28.9% ont un nombre de CD4 \geq 350 cellules/ μ l de sang.

Sur la base du protocole du Burkina Faso, pour le traitement des personnes infectées par le VIH, 21,1% des patients devraient être sous un traitement aux ARV.

Tableau 4 : Répartition des patients en fonction des niveaux de CD4

		Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
Valide	<200	16	21,1	21,1
	[200,350[38	50,0	71,1
	\geq 350	22	28,9	100,0
	Total	76	100,0	

La répartition des patients en fonction des stades cliniques de l'OMS montre que 19,7% des patients sont au stade 1 ; 48.7% au stade 2 ; 27,6% sont au stade 3 et 3,9% au stade 4 de la maladie. Sur la base du protocole de l'OMS tous les patients au stade 4 doivent être traités ainsi que ceux du stade 3 si l'on ne dispose pas de la numération des CD4. Selon cette définition théoriquement 31.5% des patients devraient être sous un traitement aux ARV.

L'analyse de nos données montre que 42,1% des patients sont sous un traitement aux ARV, cette valeur est supérieure à celle qu'on aurait due avoir selon la définition de l'OMS et selon le protocole du Burkina Faso. Cette incohérence se justifie par le fait que pour un bon suivi des PVVIH il est nécessaire de disposer de la charge virale du patient. Dans la réalité, certains patients ont un nombre de CD4 élevé mais nécessitent un traitement aux ARV du fait de la charge virale élevée. D'autres ont un nombre de CD4 inférieur à 200 cel/ μ l mais ne présentent pas de signes cliniques apparents qui permettent leur classification dans les stades cliniques définis par l'OMS. Toutes ces situations posent des problèmes quant au bon suivi des patients et expliquent la différence entre ceux qui doivent être théoriquement sous traitement et ceux qui le sont dans la réalité.

Aussi il est reconnu que les adultes africains, par rapport aux Européens, présentent une lymphocytose physiologique relative et souvent absolue[40]. Logiquement, cette lymphocytose absolue devrait avoir un impact sur la numération des CD4 en valeur absolue. Les conséquences de cette lymphocytose physiologique observée chez les Africains influencent l'interprétation de la valeur des lymphocytes T CD4 au cours de l'infection à VIH. En effet, à des pourcentages équivalents de lymphocytes T CD4, les adultes infectés par le VIH en Afrique de l'Ouest ont 100 et 200 cel / μ l de lymphocytes T CD4 plus élevé que leurs homologues Européens. Ainsi, à un nombre équivalent de Lymphocytes T CD4, les adultes infectés par le VIH en Afrique sont susceptibles de présenter une plus forte immunodépression. Lorsque les seuils de CD4 de 200 et 500 cellules/ μ l sont appliqués en Europe, il pourrait être approprié d'appliquer un seuil de 250 et 700 cellules/ μ l en Afrique de l'Ouest[40]. Ceci permettra d'améliorer la prise en charge des patients dans notre contexte.

Le tableau 5 montre que parmi les patients qui ont un nombre de CD4 < 200 cel/ μ l, 62,5% sont sous un traitement aux ARV et 37,5% ne le sont pas encore. Ceci dénote une incohérence sur la base du protocole de l'OMS. En effet, selon les recommandations de l'OMS, quel que soit le stade clinique du patient, le traitement doit être administré lorsque le nombre de CD4 < 200 cel/ μ l.

Tableau 5 : Tableau croisé niveau de CD4/Traitement ARV

Niveau de CD4	Traitement ARV		Total
	OUI	NON	
<200	62,5%	37,5%	100%
[200,350[36,8%	63,2%	100%
≥ 350	36,4%	63,6%	100%
Total	42,1%	57,9%	100%

II.3. Profil cytométrique des leucocytes des patients

Deux types de profils des leucocytes se dégagent chez les patients inclus dans cette étude. Le premier profil qui présente une zone de confusion entre la fenêtre des lymphocytes T CD4 et celles des monocytes ; et le second profil qui présente des lymphocytes T CD4 et des monocytes avec des gammes de fluorescence chevauchantes. L'étude statistique montre que 36,5% des patients ont un profil où il ya une zone de confusion entre la fenêtre des lymphocytes T CD4 et celle des monocytes ; et 63,5% des patients ont un profil de leucocytes où des lymphocytes et des monocytes ont des gammes de fluorescence chevauchantes.

➤ Profil cytométrique avec une zone de confusion entre les lymphocytes T CD4 et les monocytes : ce groupe de patients représente ceux dont le cytogramme montre une zone de confusion entre la fenêtre des lymphocytes T CD4 et celle des monocytes. Chez ces patients il n'y a pas de séparation nette entre les monocytes et les lymphocytes T CD4. Ainsi on peut donc prendre certains lymphocytes pour des monocytes et réciproquement. Mais dans la réalité la valeur de CD4 donnée est réelle dans la mesure où, la position du curseur permet de retrancher les cellules des deux populations cellulaires qui passent de part et d'autre des deux fenêtres. Toutefois cela demande une bonne expérience de la part du technicien.

➤ Profil cytométrique avec gamme de fluorescence chevauchante entre lymphocytes T CD4 et monocytes : dans ce groupe de patients contrairement au précédent, nous avons une séparation nette entre les monocytes et les lymphocytes T CD4. La particularité est que les monocytes et les lymphocytes T CD4 ont des gammes de fluorescence chevauchantes. Dans ce second cas on a donc certains monocytes qui ont le même niveau de

fluorescence que d'autres lymphocytes T CD4. Ce qui implique que lors de la numération des lymphocytes T CD4 à travers le mono-marquage on aura une zone de confusion entre les monocytes et les lymphocytes ce qui nous ramène au schéma précédent.

Le changement du profil du cytogramme observé pourrait être consécutif à une perte des récepteurs CD4 aussi bien à la surface des lymphocytes T CD4 que des monocytes. Le mécanisme à l'origine de ce phénomène n'est pas bien compris mais il existe une corrélation entre la diminution des récepteurs CD4 et la réplication virale. Toutefois la diminution de l'expression des récepteurs CD4 interviendrait au niveau post-transcriptionnel. Il a été montré que dans les cellules infectées par le VIH-1 on assiste à la formation de complexe entre les glycoprotéines gp 160 du virus et les molécules de CD4 nouvellement synthétisées. Ces formations empêchent le transport des molécules de CD4 sur la surface membranaire de la cellule[18].

II.4. Traitement ARV suivi

II.4.1. Temps d'attente avant la mise sous traitement

Il s'agit de l'intervalle de temps entre la découverte de la sérologie et la mise des patients sous un traitement aux ARV. L'analyse statistique montre que l'intervalle de temps moyen avant la mise sous ARV est de 3,0667 mois. Selon le Tableau 5, 13,8% des patients découvrent leur statut sérologique et entament dans le même mois un traitement aux ARV ; et 51,7% des patients commencent leur traitement aux ARV dans les trois mois qui suivent la découverte de leur statut sérologique. Ceci montre que la plupart des patients arrivent dans les centres de prise en charge à un stade tardif de la maladie. Nombreux sont les patients qui découvrent leur statut sérologique de façon fortuite souvent des suites de zona récidivants. Ils arrivent ainsi à un niveau d'immunodépression très avancé et nécessitent donc la mise sous un traitement aux ARV. Le dépistage étant obligatoire pour les femmes enceintes, elles sont nombreuses qui découvrent leur statut sérologique au cours de la grossesse et leur mise sous un traitement aux ARV intervient aussitôt pour réduire le taux de transmission du virus de la mère à l'enfant.

Toutes ces raisons expliquent le fait que près de la moitié de nos patients sont mis sous un traitement aux ARV dès les trois premiers mois après la découverte de leur statut sérologique.

Tableau 6 : Temps d'attente avant la mise sous ARV

Temps d'attente en mois	Pourcentage	Pourcentage cumulé
,00	13,8	13,8
1,00	6,9	20,7
1,03	10,3	31,0
2,03	6,9	37,9
2,07	3,4	41,4
3,03	3,4	44,8
3,07	6,9	51,7
4,00	3,4	55,2
4,03	3,4	58,6
4,07	6,9	65,5
6,07	3,4	69,0
8,17	6,9	75,9
11,13	6,9	82,8
14,20	3,4	86,2
16,27	6,9	93,1
36,53	3,4	96,6
53,80	3,4	100,0
Total	100,0	

II.4.2. Traitements ARV

Quand nous considérons le traitement aux ARV, nous constatons selon le Tableau 5, que 42,1% des patients sont sous un traitement aux ARV. La répartition des patients sous un traitement aux ARV en fonction des molécules utilisées montre que 71% sont sous D4T+3TC+NEV/EFV et 29% sont sous +3TC+NEV/EFV/kalétra. Le croisement du traitement aux ARV avec le sexe du patient montre que : 55% des hommes sont sous un traitement aux ARV contre 37,5% chez les femmes.

Selon les données, les hommes sont quatre fois moins nombreux que les femmes mais sont trois fois plus nombreux à être mis sous un traitement aux ARV. Ceci montre que la progression de la maladie serait plus rapide chez l'homme que chez la femme. Aussi en général peu soucieux de leur état de santé, les hommes arrivent tardivement dans les centres de santé. Toutes ces raisons pourraient donc expliquer cette forte proportion des hommes sous un traitement aux ARV.

Tableau 7 : Tableau croisé Sexe du patient/Traitement aux ARV

Sexe des patients	Traitement ARV		Total
	OUI	NON	
Homme	55,0%	45,0%	100,0%
Femme	37,5%	62,5%	100,0%
Total	42,1%	57,9%	100,0%

Le croisement du type de protocole thérapeutique suivi avec l'observance du traitement aux ARV montre que, pour les patients qui sont sous D4T+3TC+NEV/EFV, nous avons selon le tableau 8 : 84,2% de patients qui ont une bonne observance, 10,5% n'observent pas bien le traitement et 5,3% sont perdus de vue.

Tableau 8 : Observance du traitement D4T+3TC+NEV/EFV

	Pourcentage	Pourcentage cumulé
	observant	84,2
inobservant	10,5	94,7
inconnu	5,3	100,0
Total	100,0	

Pour les patients qui sont sous AZT+3TC+NEV/EFV/kaletra, nous avons selon le tableau 9 : 77,8% de patients qui ont une bonne observance contre 22,2% qui n'ont pas une bonne observance du traitement aux ARV ; mais il n'y a pas de perdu de vue dans ce second cas.

Tableau 9 : Observance du traitement D4T+3TC+NEV/EFV

	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
observant	7	77,8	77,8
inobservant	2	22,2	100,0
Total	9	100,0	

La proportion générale des patients sous un traitement aux ARV qui est de 42,1% ne permet pas de conclure que le traitement aux ARV serait à l'origine du profil particulier des patients inclus dans cette étude. Cependant, malgré les effets secondaires induits par la prise des ARV nous avons 84,2% des patients qui sont sous D4T+3TC+NEV/EFV et 77,8% des patients qui sont sous AZT+3TC+NEV/EFV/kalétra qui ont une bonne observance.

L'analyse des différents caractéristiques des patients tels que l'âge, le sexe, le type de VIH, le niveau d'immunodépression, le temps d'attente avant la mise sous un traitement aux ARV, l'observance, du traitement ainsi que les différents protocoles thérapeutiques utilisés n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation significative qui pourrait expliquer le profile cytométrique des patients inclus. Pourtant la particularité des profils montre une modification hématologique chez ces patients. La question reste donc toujours posée et le travail mérite d'être poursuivit ; plus particulièrement l'exploration de la modulation de l'expression des récepteurs CD4 des lymphocytes T CD4 et des monocytes infectés par le VIH.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'utilisation de la cytométrie en flux pour la numération des lymphocytes T CD4 nous a permis dans cette étude, d'identifier les PVVIH qui ont des profils de cytogramme avec une zone de confusion entre les monocytes et les lymphocytes T CD4. L'analyse des caractéristiques des patients tels que l'âge, le sexe, le type de VIH, le niveau d'immunodépression, le temps d'attente avant la mise sous un traitement aux ARV, l'observance, la durée du traitement ainsi que les différents protocoles thérapeutiques utilisés, n'a pas permis de déterminer les facteurs à l'origine de l'interférence des monocytes sur la numération des lymphocytes T CD4. Si les facteurs n'ont pas été déterminés ce n'est pas parce qu'ils n'existent pas mais parce que l'environnement du travail ne l'a pas permis. Certaines données ne sont pas disponibles ; c'est le cas de l'état clinique des patients. Aussi pour une grande majorité des patients certaines données hématologiques ne sont pas disponibles également. Les perspectives d'études envisagées après ces travaux sur le suivi biologique des PVVIH sont :

- Faire la NFS des patients et comparer les résultats avec celles obtenus par la cytométrie en flux.
- Faire la numération plusieurs fois chez le même patients pour voir l'évolution du profile du cytogramme en fonction du temps.
- Suivre les patients pour connaître leur état clinique étant donné que cela n'est pas disponible dans les dossiers des patients.
- Inclure l'analyse de l'expression d'autres marqueurs
- Etudier les processus de transport et d'adressage des molécules CD4 néo-synthétisées
- Prévoir un protocole de lavage des cellules avant de les passer en CMF ce qui rendrait les molécules de CD4 plus accessible et pourrait donner un éclairage sur ce phénomène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Jacqueline E., Eric C. (2001). **Biochimie génétique Biologie moléculaire**. 7e Edition masson.
2. Comité Ministériel de Lutte Contre le VIH/SIDA (2008). **Normes et protocoles de prise en charge médicale des personnes vivants avec le VIH au BURKINA FASO**. Ministère de la santé, BURKINA FASO; 3:143.
3. Joseph I., Sarah K. (2006). **Understanding the Scourge of HIV/AIDS in Sub-Saharan Africa**. *Journal of the International AIDS Society* 2006,30:1-8.
4. Groupe de Travail BIOLOGIE - GIP ESTHER (2006). **Mesure du taux de lymphocytes T CD4 et mesure de la charge virale: Marqueurs de diagnostic et de suivi biologique de l'infection par VIH**. 12P
5. PARTEC. **CyFlow® Counter Manuel d'utilisation**.
6. **Tortora, Funke, Case. Introduction à la microbiologie**. Edition du Renouveau Pédagogique INC Adaptation française : Louise Martin.
7. Ashlee M., Jay N., Grover C. B. Jr. (1998) **The Influence of Human Immunodeficiency Virus-1 on Hematopoiesis**. *Journal of The American Society of Hematology* 1998, 91:1479-1495.
8. Myron S. C., Nick H., Jay A. L., Kevin D., and Joep L. (2008). **The spread, treatment, and prevention of HIV-1: evolution of a global pandemic**. *Journal of Clinical Investigation* April 2008, 118:1244-1254.
9. Michel L. N., Thomas d'Aquin Toni, Bluma G. B, Ricardo J. C., and Mark A. W. (2009) **Antiretroviral Drug Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 2. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY** Sept. 2009, 53:3611-3619.
10. Hervé J.A. Fleury. **Virologie Humaine**. 4^e Edition MASSON 2002.
11. www.techno-science. Du 17/02/2009.
12. OMS (1988). **Immunologie de l'infection par le VIH et du SIDA: Memorandum d'une Reunion OMS/UISI**. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Sante* 1988, 66: P 35-46.
13. <http://www.avert.org/media/content/graphs/subtypes.jpg>. du 19/03/2010.
14. Antoinette C van der Kuyl and Marion Cornelissen (2007). **Identifying HIV-1 dual infections**. *Retrovirology* July 2007, 67:1-12.
15. Stephen D. L., Salvatore T. B., and Thomas M. F. (2001). **Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection**. *Clinical Microbiology Reviews* Oct. 2001, 14:753 - 777.

16. Juan Lama, Vicente Planelles. **Host factors influencing susceptibility to HIV infection and AIDS progression.** *Retrovirology* 2007, **52(4)**: 1-25.
17. Cécile H., Florence A., Bernard J. and Michel S. (2002) **Study of the HIV-1 receptors CD4, CXCR4, CCR5 and CCR3 in the human and rat testis.** *Molecular Human Reproduction* 2002,**8**: 419-425.
18. Muhammad S., Barbara V., Ming-Chu Hsu, and David J. V. (1992). **Restoration of Cell Surface CD4 Expression in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Cells by Treatment with a Tat Antagonist.** *JOURNAL OF VIROLOGY* Nov. 1992, **66** : 6802-6805.
19. Carol A.Carter and Lorna S.Ehrlich. **Cell Biology of HIV-1 Infection of Macrophages.** *Annual Review of Microbiology* 2008, **62**:425–443.
20. Edana C., Massimo A., Priscilla B., and Guido P (2006). **Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence.** *Journal of Leukocyte Biology* 2006, **80**:1018-1030.
21. Masha Sorin, Jennifer Cano, Supratik Das, et al., **Recruitment of a SAP18-HDAC1 Complex into HIV-1 Virions and Its Requirement for Viral Replication.** *PLoS Pathogens* June 2009, **5**:1-15.
22. Nicolas Sluis-Cremer and Gilda Tachedjian. **Mechanisms of inhibition of HIV replication by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors.** *Virus Res.* June 2008; **134**:147–156.
23. Pr Yves TRAORE. **Cours d'Immunologie, Maîtrise de Biochimie-Microbiologie.** 2007-2008.
24. Joseph M. McCune MD, PhD. **Mechanisme of T-Cell Depletion and Regeneration in HIV Disease.** *Physician's Research Network NotebookTM* September 2002, **7** :4-9.
25. Judie B. Alimonti, T. Blake Ball, Keith R. Fowke. **Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS.** *Journal of General Virology* 2003, **84**:1649-1661.
26. Rachel A. R., Roger S. L., Robert E. F and Warren W. Jr. (1991). **The natural history of HIV-1 infection: staging classifications of disease.** *AIDS* 1991, **5**:355-364.
27. Adriano Boasso and Gene M Shearer. **Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis.** *Clin Immunol* 2008 March, **126**:235-242.
28. Albert M, Christine D, Yao Abo, et al., (2007). **Progression to WHO criteria for antiretroviral therapy in a 7-year cohort of adult HIV-1 seroconverters in Abidjan, Côte d'Ivoire.** *Bulletin of the World Health Organization* 2007,**85**:116-123.
29. Family Health International.org. **Stades cliniques et critères de détermination de l'OMS pour entamer le traitement ARV.** 2007

30. OMS. **Traitement antirétroviral de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent en situation de ressources limitées : vers un accès universel recommandations pour une approche de santé publique.** Version 2006.
31. Nancy Nguyen, Mark Holodniy. **HIV infection in the elderly.** *Clinical Interventions in Aging* 2008, 3:453–472.
32. Christophe Duperray **La Cytométrie en flux (définition et principes)** <http://cytobase.montp.inserm.fr/> 20 oct 2009: 23
33. David B., Brooke W., Alan L., and Thomas N. Denny. **CD4 immunophenotyping in HIV infection.** *Nat Rev Microbiol* 2008, 6:1-18.
34. Roger S. Riley MD, Ph.D. and Michael Idowu, M.D. **Principles and Applications of Flow Cytometry.** Department of Pathology Medical College of Virginia/VCU Health Systems Virginia Commonwealth University Richmond, VA. 2003:1-15.
35. Ulrich Sack, Attila Tárnok, Gregor Rothe. **Cellular Diagnostics: Basic principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry;** 2009.
36. BD Biosciences 2350 Qume Drive San Jose, CA. **Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide;** April, 2000.
37. M.J. Wilkerson. **Principles of Flow Cytometry and Cell Sorting.** *Annual American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology*, Middleton WI, USA; 13-Nov-2004.
38. Maurice R. G., O’Gorman and Lynn S. Zijenah. **CD4 T cell Measurements in the Management of Antiretroviral Therapy—A Review with an Emphasis on Pediatric HIV-Infected Patient.** *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2008, 74B:19–26
39. http://www.who.int/gender/hiv_aids/fr/. 23/03/2010.
40. Anglaret Xavier, Diabougba Serge, Mortier Emmanuel, et al., **Numération des CD4 + des lymphocytes T dans l'infection à VIH: Les normes européennes sont applicables aux patients africains?** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology* 1997, 14:361-363.